



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**A MICROBIOTA ORAL E O SEU POTENCIAL NO CANCRO
ESOFÁGICO**

Trabalho submetido por
Inês Alho
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Setembro de 2021



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**A MICROBIOTA ORAL E O SEU POTENCIAL NO CANCRO
ESOFÁGICO**

Trabalho submetido por
Inês Alho
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutor Paulo Maia

Setembro de 2021

Agradecimentos

Ao meu orientador, Professor Doutor Paulo Maia, por todo o apoio, dedicação e disponibilidade ao longo deste percurso. O meu mais profundo agradecimento por me ter guiado na finalização desta etapa e por todo o trajeto repleto de simpatia, generosidade e respeito pelo ensino.

Ao Instituto Universitário e Clínica Universitária Egas Moniz, todos os pacientes, professores e funcionários que contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

À minha família, por todo o orgulho que sempre fizeram questão de me demonstrar ao longo do caminho. Pelo amor, carinho e desejo de me ver vencer sempre. Em especial à Rita por todo o cuidado, dedicação e estima, os quais tornas-te o teu propósito todos os dias, o meu mais sincero obrigada.

Aos que já partiram, que não podia deixar de mencionar, Avô Eurico, Avó Encarnação, Avó Tita e Avô Santana, obrigada por todos os ensinamentos e por terem partilhado comigo o início desta conquista, sei que teriam querido vê-la concluída a meu lado. Ficará a eterna saudade.

A todas as amigas que me acompanharam durante estes anos, principalmente as que construí nesta casa e que irei recordar eternamente as inesquecíveis memórias que construímos ao longo destes 5 anos. Não poderia deixar de mencionar a minha querida amiga Carlota Maça, que tenho o prazer de ter comigo do primeiro ao último dia desta viagem, obrigada por todas as vivências que partilhamos, pelo companheirismo e amizade dentro e fora da faculdade. À minha Sabina Reabciuck, por todas as emoções, aventuras e irmandade com que me presentaste e por todas as que ainda hão de vir. À Joana Lino, uma agradável surpresa pelo caminho que se tornou numa verdadeira amiga com quem partilho muitos risos, entreajuda e nunca esquecerei tudo o que aprendemos e partilhámos juntas.

Finalmente, o agradecimento mais especial, aos meus pais, obrigada por exigirem sempre o melhor de mim, por nunca me deixarem desistir e por acreditarem sempre nas minhas capacidades mesmo quando eu própria não acreditava. Por toda a confiança depositada em mim, sempre com o maior apoio, dedicação e amor. Esta conquista não é só minha, é nossa!

Resumo

O cancro esofágico é a oitava patologia oncológica mais frequente e a sexta principal causa de morte por cancro mundialmente (Chen, Yuan, Lu, Zhang, Jin & Ye, 2017). Os tumores esofágicos leves são raros, é a sua forma maligna que aparenta ser mais frequente (Malinowski, Wesierska, Sokolowska & Zalewska, 2019). A microbiota oral parece ter influência nas duas formas de malignidade desta neoplasia, no adenocarcinoma do esófago (ACE) e no carcinoma de células escamosas do esófago (CCEE).

Na cavidade oral, inúmeras bactérias formam uma comunidade bacteriana complexa e estável, que pode desempenhar um papel importante nas doenças orais e sistêmicas. Considerando que a microbiota oral é constantemente deglutida com a saliva é razoável considerar que esta migração de bactérias orais, pode contribuir para a carcinogénese esofágica (Shinya, Toru, Kenji, Mikari, Rie, Michiko, Yukie et al., 2019).

Existem evidências acumuladas de que a disbiose microbiana no trato digestivo superior é um fator de risco potencial na etiologia do cancro esofágico (Peters, Wu, Pei, Yang, Purdue, Freedman, Jacobs et al., 2017). Estudos recentes revelam que, perante esta patologia, a microbiota oral abriga uma diversidade microbiana geral diminuída em paralelo com uma alteração do consórcio microbiano, com um enriquecimento de bactérias como *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*. Estas bactérias parecem participar na carcinogénese através de diferentes mecanismos, podendo inibir a apoptose, ativar a proliferação celular, promover a invasão celular, induzir inflamação crónica e a produção de carcinogénico (Qi, Jiao, Chen, Kong, Gu, Liu, Feng et al., 2020).

Neste contexto, o objetivo desta revisão da literatura foi avaliar, através de uma revisão bibliográfica dos últimos 15 anos, nas bases de dados PUBMED, B-On, Google Académico, Cochrane, os possíveis mecanismos que associam algumas das bactérias da microbiota oral com os estágios de iniciação, promoção e progressão do cancro do esófago.

Palavras-chave: Cancro esofágico, Microbiota oral, Adenocarcinoma do esófago, Carcinoma de células escamosas do esófago.

Abstract

Esophageal cancer is the eighth most frequent cancer and the sixth leading cause of cancer death worldwide (Chen, Yuan, Lu, Zhang, Jin & Ye, 2017). Mild esophageal tumors are rare, it is their malignant form that appears to be more frequent (Malinowski, Wesierska, Sokolowska & Zalewska, 2019). The oral microbiota seems to influence the two forms of malignancy of this neoplasm, esophageal adenocarcinoma (EAC) and esophageal squamous cell carcinoma (SCC).

In the oral cavity, numerous bacteria form a complex and stable bacterial community that can play an important role in oral and systemic diseases. Considering that the oral microbiota is constantly swallowed with saliva, it is reasonable to consider that this migration of oral bacteria may contribute to esophageal carcinogenesis (Shinya, Toru, Kenji, Mikari, Rie, Michiko, Yukie et al., 2019).

There is mounting evidence that microbial dysbiosis in the upper digestive tract is a potential risk factor in the etiology of esophageal cancer (Peters, Wu, Pei, Yang, Purdue, Freedman, Jacobs et al., 2017). Recent studies reveal that, in view of this pathology, the oral microbiota harbors a general microbial diversity decreased in parallel with an alteration of the microbial consortium, with an enrichment of bacteria such as *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema denticola* and *Tannerella forsythia*. These bacteria seem to participate in carcinogenesis through different mechanisms, being able to inhibit apoptosis, activate cell proliferation, promote cell invasion, induce chronic inflammation and carcinogen production (Qi, Jiao, Chen, Kong, Gu, Liu, Feng et al., 2020).

In this context, the objective of this literature review was to evaluate, through a literature review of the last 15 years, in the databases PUBMED, B-On, Academic Google, Cochrane, the possible mechanisms that associate some of the bacteria of the oral microbiota with the stages of initiation, promotion and progression of esophageal cancer.

Keywords: Esophageal cancer, Oral microbiota, Esophageal adenocarcinoma, Esophageal squamous cell carcinoma.

Índice

I.	Introdução.....	21
II.	Desenvolvimento.....	26
	1. Mecanismos que apoiam a relação entre bactérias orais e a carcinogénese.....	26
	1.1 <i>Porphyromonas Gingivalis</i>	29
	1.1.1 Atividade Anti-apoptótica.....	30
	1.1.2 Processo de Inflamação Crónica.....	35
	1.1.3 Aumento da invasão celular.....	38
	1.2 <i>Fusobacterium Nucleatum</i>	41
	1.3 <i>Treponema Denticola</i>	44
	1.4 <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>	46
	1.5 <i>Tannerella Forsythia</i>	50
	1.6 <i>Streptococcus Anginosus</i>	52
	1.7 Substâncias Carcinogénicas.....	56
	2. O cancro esofágico.....	58
	2.1. Adenocarcinoma Esofágico.....	62
	2.2. Carcinoma de Células Escamosas do Esófago.....	65
	3. A influência da resposta imune do hospedeiro.....	69
	4. O papel das bactérias na deteção, prevenção e tratamento do cancro.....	66
III.	Conclusão.....	77
IV.	Bibliografia.....	79

Índice de Figuras

Figura 1- A influência das bactérias orais na patogénese do cancro. (Adaptado de Karpiński, 2019).....	29
Figura 2- Via mitocondrial da apoptose. (Adaptado de Silva, 2014).....	31
Figura 3- Interações entre <i>P. gingivalis</i> e células epiteliais que podem produzir um fenótipo oncogénico. (Adaptado de Whitmore & Lamont, 2014).....	35
Figura 4- Possíveis mecanismos que conduzem ao cancro causados por <i>Porphyromonas gingivalis</i> . (Adaptado de Zhou & Luo, 2019).....	38
Figura 5- Mecanismos de interação entre a <i>F. nucleatum</i> e as células epiteliais que podem produzir um fenótipo oncogénico. (Adaptado de Whitmore & Lamont, 2014).....	44
Figura 6- A relação entre <i>T. denticola</i> e a iniciação e desenvolvimento da carcinogénese. (Adaptado de Zhang, Wang, Wang, Tang, Tang & Liang, 2019).....	46
Figura 7- Mecanismos dos fatores de virulência de <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> que induzem alterações nas células do hospedeiro. (Adaptado de Sun, Z., Xiong, C., Teh, S.W., et al., 2019).....	49
Figura 8- Possíveis mecanismos causado por <i>Tannerella Forsythia</i> e a sua influência na patogénese do cancro. (Figura do autor).....	52
Figura 9- A Associação de <i>S. anginosus</i> com a iniciação e desenvolvimento da carcinogénese. (Adaptado de Zhang, Wang, Wang, Tang, Tang & Liang, 2019).....	55

Lista de Siglas

α -1-AC - alfa-1-antiquimotripsina

ACE - Adenocarcinoma Esofágico

ADA - Adenosina Desaminase

ADH - Álcool Desidrogenase

ADN - Ácido Desoxirribonucleico;

ADNg - Ácido Desoxirribonucleico genómico

ADNr - Ácido Desoxirribonucleico recombinante

ADP - Adenosina Difosfato

Akt - Proteína quinase B

anti-PD-1 - Anti-proteína de morte celular programada 1

Apaf-1 - Fator de ativação de protease associada à apoptose 1

ARN - Ácido Ribonucleico

ARNm - Ácido Ribonucleico mensageiro

ARNr - ARN ribossómico

ATM - Ataxia Telangiectasia Mutada

ATP - Trifosfato de Adenosina

B7-H1 - Recetor da família B7 homólogo 1

Bak - Assassino de antagonista homólogo de Bcl-2;

Bax - Proteína X associada a Bcl-2;

Bcl-2 - Linfoma 2 de células B;

Bcl-xL - Linfoma Bcl-2 extra grande;

Bfl-1 - Bcl-2-related protein A1

CagE - Gene E associado à citotoxina

CCE - Carcinoma das Células Escamosas

CCEE - Carcinoma de Células Escamosas do Esófago

CCR - Cancro Colorretal

CDK - Cinase Dependente da Ciclina

CDKN2A - Inibidor de Cinase Dependente de Ciclina 2A

CD46 - Proteína do Coeficiente de Membrana

Cdt - Toxinas Citoletais Distencivas

CdtA - Toxinas Citoletais Distencivas A

CdtB - Toxinas Citoletais Distencivas B

CdtC - Toxinas Citoletais Distencivas C

CE - Cancro Esofágico

CEO - Carcinoma Epidermóide Oral

CK1delta - Casein kinase 1 delta

CK1epsilon - Casein kinase 1 epsilon

Cox-2 - Cyclooxygenase-2

CTLP - Proteinase semelhante a quimiotripsina

DDR - DNA Damage Response

DSB - Quebra de dupla fita

DRGE - Doença do Refluxo Gastroesofágico

EAC - Esophageal adenocarcinoma

EB - Esófago de Barrett

ELAMs - Moléculas de Adesão de Leucócitos Endoteliais

EMT - Transição Epitelial-mesenquimal

EoE - Esofagite eosinofílica

Erk - Extracellular signal-regulated kinases

ERK1 - Extracellular signal-regulated kinases 1

FCFb - Fator de crescimento de fibroblastos básico

FimA - Fimbrilina A

GEC - Células Epiteliais Gengivais

GI - Gastrointestinal

HBD-2 - beta-Defensina-2 humana

HNSCC - Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

HR - Recombinação Homóloga

HSP27 - Proteína de choque térmico 27

H₂S - Sulfeto de hidrogênio

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

ICAM - Molécula de adesão intercelular

IgA - Imunoglobulina A

IgG - Imunoglobulina G

IL-1 α - Interleucina-1alfa

IL-1 β - Interleucina-1beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 - Interleucina 8

IL-10 - Interleucina 10

IL-12 - Interleucina 12

IL-17 – Interleucina 17

IL-23 – Interleucina 23

ITIM - Motivo de inibição baseado em tirosina

JAK1 - Janus Kinase 1

KRAS – Gene Homólogo do Vírus do Sarcoma de Kirsten

LEfSe - Linear discriminant analysis Effect Size

LPS - Lipopolissacarídeos

LPS-G - Lipopolissacarídeo G

LRR - Repetição Rica em Leucina

LtxA - Leucotoxina

MAPK - Mitogen-activated protein kinase

MCF-7 - Michigan Cancer Foundation-7

Mcl-1- Leucemia de células mieloides 1;

MIMO - Maltosil-isomaltooligossacarídeo

MMP - Metaloproteinases de matriz

MMP-8 - Metaloproteinases da Matriz 8

MMP-9 - Metaloproteinases de matriz 9

MMP-13 - Metaloproteinases de matriz 13

miRNA- Micro ácido ribonucleico

miR-21 - Micro ácido ribonucleico 21

miR-203 – Micro ácido ribonucleico 203

miR-663 - Micro ácido ribonucleico 663

MyD88- Resposta primária da diferenciação mielóide 88

NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NDK - Nucleosídeo Difosfato Quinase

NF-kB - Factor Nuclear kappa B

NHEJ - União de Extremidades não Homólogas

NK - Natural Killer

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

N₂O₃ - Trióxido de dinitrogénio

O₂⁻ - Anião superóxido

ONOO - Peroxinitrito

OSCC - Carcinoma Oral das Células Escamosas

PAR2 - Receptor ativado por protease do tipo 2

PAR4 - Receptor ativado por protease do tipo 4

PBMCs - Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano

PD-1 - Proteína de morte celular programada 1

PD-L1 - Ligante de morte programada 1

PD-L2 - Ligante de morte programada 2

pERK - Extracellular signal- regulated protein kinases

PI3K - Phosphoinositide 3-kinase

PIP3 - Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato

PI-3K - Fosfoinosítídeo 3-quinase

PG- Prostaglandina

PGE2 - Prostaglandina E2

pGSK3 β - Antifosforilação da glicogénio sintase quinase-3beta

pro-MMP-8 - Pro metaloproteinases de matriz 8

proMMP-9 - Pro metaloproteinases de matriz 9

PMBCs - Células Sanguíneas Mononucleares Periféricas

PMNs - Neutrófilos Polimorfonucleares

PPI - Proton Pump Inhibitor

PUMA - Modulador de apoptose regulado positivamente por p53.

P2X7 - Subtipo de recetor purinérgico

p53 - Proteína supressora de tumor

RAC1 - Substrato 1 da toxina botulínica C3 relacionada com Ras

RhoA - Membro da família Ras homólogo A

RNS - Espécies reativas de nitrogénio

ROS - Espécies reativas de oxigénio

RTX - Repeats in ToXin

SAS – Linhagem celular

SASP - Fenótipo secretor associado à senescência

Ser392 - Invitrogen Anti-Phospho-p53

SIBO - Supercrescimento bacteriano no intestino delgado

SOCS3 - Supressor de sinalização de citocina 3

SOD- Superóxido dismutase

SCC - Esophageal squamous cell carcinoma

STAT3 - Signal transducer and activator of transcription 3

Td-(CTLP) - Proteinase semelhante à quimiotripsina de *T. denticola*

TIGIT - Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM

TIMP - Inibidores teciduais de metaloproteinases derivadas da matriz

TIMP-1 - Inibidores teciduais de metaloproteinases derivadas da matriz 1

TIMP-2 - Inibidores teciduais de metaloproteinases derivadas da matriz 2

TGFβ - Fator de crescimento transformante beta

Thr160 - Resíduo de treonina

TLR - Recetor Toll-like

TLR2 - Recetor Toll-like 2

TLR4 - Recetor Toll-like 4

TLR5 - Recetor Toll-like 5

TLR7 - Recetor Toll-like 7

TLR9 - Recetor Toll-like 9

TNF - Fator de Necrose Tumoral

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral alfa

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VSC - Compostos de Enxofre Voláteis

Wnt - Wingless-related integration site

Lista de Abreviaturas

A. actinomycetemcomitans - *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

F. nucleatum - *Fusobacterium nucleatum*

H. pylori - *Helicobacter pylori*

P. gingivalis - *Porphyromonas gingivalis*

S. anginosus - *Streptococcus anginosus*

S. mitis – *Streptococcus mitis*

T. denticola - *Treponema denticola*

T. forsythia - *Tannerella Forsythia*

I. Introdução

O cancro é um dos problemas mais significativos no mundo moderno, que preocupa toda a população. Nos países desenvolvidos é a segunda maior causa de morte, depois das doenças cardiovasculares, com uma taxa de mortalidade relativamente elevada.

O cancro esofágico (CE) é a oitava patologia oncológica mais frequente e a sexta principal causa de morte por cancro em todo o mundo (Gao, Li, Ma, Liang, Shan, Zhang, Zhu et al., 2016). Os tumores esofágicos leves são raros, é a sua forma maligna que aparenta ser mais frequente, integrando 2% de todos os tumores malignos. Existem duas formas de malignidade: o carcinoma de células escamosas (90% dos casos) e o adenocarcinoma (10%). Atualmente existe uma tendência para a queda do carcinoma de células escamosas e um aumento do adenocarcinoma (Gluszek, Kot, Kotucha, Stepień & Koziel, 2014).

...—

Todos os anos, ocorrem 12,7 milhões de novos casos de cancro em todo o mundo, e cerca de 16,1% estão ligados a infeções. Aproximadamente 15% a 20% dos tumores humanos são induzidos por processos inflamatórios (Francescone, Hou & Grivennikov, 2014).

A microbiota oral consiste em >700 espécies bacterianas (Filoche, Wong & Sissons, 2010; Ikeda, Shiba, Ikeda & Suda, 2019), das quais várias bactérias específicas foram identificadas como patógenos periodontais, como o complexo vermelho (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola* e *Tannerella forsythia*) (Pérez-Chaparro, Gonçalves, Figueiredo, Faveri, Lobão, Tamashiro, Duarte & Feres, 2014). Estas bactérias periodontogénicas interrompem a homeostasia do hospedeiro, contribuindo assim para o desenvolvimento da doença.

Ao longo dos anos, tem vindo a ser cada vez mais evidente que a doença periodontal e perda de dente estão associadas a um risco aumentado de doenças sistémicas, incluindo diabetes, doença cardiovascular, cancro GI (gastro-intestinal),

(Michaud, Lu, Peacock-Villada, Barber, Joshu, Prizment, Beck et al., 2017) e outras doenças e condições (Winning & Linden, 2015; Loos, 2016). Está bem estabelecido que a infeção bacteriana resultante da disbiose da microbiota oral é a principal causa da doença periodontal (Hajishengallis, Darveau & Curtis, 2012). A inflamação crónica e desregulação imunológica resultante de bactérias orais ou dos seus produtos pode ter efeitos sistémicos, que podem ser os fatores latentes associados à saúde e à doença (Ahn, Chen & Hayes, 2012; Mascitti, Togni, Troiano, Caponio, Gissi, Montebugnoli, Procaccini et al., 2019).

Estudos epidemiológicos, têm vindo a determinar vários fatores de risco bem definidos para o cancro, incluindo idade, hereditariedade, dieta, consumo de tabaco, infeções virais crónicas e a inflamação. Paradoxalmente, o sucesso desses estudos deixou pouco espaço para a incorporação de quaisquer novos fatores ou agentes causais e, consequentemente, a ideia de que uma infeção bacteriana poderia contribuir para o cancro foi geralmente desconsiderada. No entanto, estudos marcantes no início da década de 1990 estabeleceram o *Helicobacter pylori* como um agente causador da oncologia gástrica, resultando numa mudança de paradigma no que respeita à relação entre agentes microbianos e diferentes cancros (Kim, Ruiz, Carroll & Moss, 2011). De facto, em 1994, a *H. pylori* (*Helicobacter pylori*) tornou-se a primeira espécie bacteriana a ser oficialmente reconhecida pela Organização Mundial da Saúde como uma causa definitiva de cancro em humanos. Desde então, tem havido um crescente aumento de evidências que apoiam uma associação entre microorganismos específicos, incluindo aqueles na cavidade oral, e vários tipos de patologias oncológicas.

A cavidade oral é habitada por comunidades multiespécies complexas que geralmente existem num estado imunoinflamatório de equilíbrio com o hospedeiro (Hajishengallis & Lamont, 2012). Certas espécies, como *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), podem perturbar esse equilíbrio, resultando numa interação disbiótica hospedeiro-microbiota. Subsequentemente, outros constituintes da comunidade, como *Fusobacterium nucleatum*, podem tornar-se oportunisticamente patogénicos. O efeito associado de uma comunidade microbiana disbiótica com uma resposta imune desregulada acaba por causar a doença periodontal (Hajishengallis & Lamont, 2012).

Estes organismos periodontais têm vindo a surgir como ponto focal para o desenvolvimento da associação entre a microbiota oral e a carcinogénese.

A carcinogénese é um processo com várias fases e de longa duração, pelo qual se inicia o desenvolvimento de cancro. Envolve mutações que contribuem para a destabilização do citoesqueleto e perda de adesão entre células. Estas alterações ocorrem sob a influência de substâncias cancerígenas que podem advir de espécies bacterianas (Malinowski, Wesierska, Sokolowska & Zalewska, 2019). A carcinogénese consiste em três fases: iniciação, promoção e progressão. Na fase de iniciação, ocorre uma mutação que é irreversível e é transmitida às células-filhas. Morfologicamente, manifesta-se por hiperplasia ou displasia. No estágio seguinte, ocorre a promoção, o acúmulo de mudanças genéticas e epigenéticas. Estas levam à transformação de uma célula mutada numa célula cancerígena. Tal célula sofre divisões descontroladas e é caracterizada por uma baixa capacidade de diferenciação. É caracterizada por um aumento de mobilidade, invasão celular e perda de integridade das células vizinhas. A última fase é a progressão em que as células cancerígenas adquirem a capacidade de infiltrar tecidos e de metastizar. Estas células tornam-se insensíveis a fatores regulatórios, desenvolvem-se de forma independente, sem influência de fatores de crescimento e hormonas. Quando se inicia a angiogénese as células cancerígenas secretam fatores de crescimento autocrinos e péptidos que estimulam células saudáveis a produzir agentes que aumentam a proliferação das células cancerígenas (Malinowski et al., 2019).

A carcinogénese de alguns tipos de cancro tem vindo a ser associada à inflamação crónica com início na cavidade oral e mobilização dos mediadores inflamatórios para diferentes locais do corpo humano. Associação do efeito carcinogénico com a mediação direta de bactérias periodontais, quer por ação direta nas células orais, quer por migração bacteriana oriunda da cavidade oral tem vindo a ser estudado (Hoare, Soto, Rojas-Celis & Bravo, 2019).

Embora os processos inflamatórios ocorram localmente na cavidade oral, vários estudos determinaram que a inflamação crónica durante as doenças periodontais ou a disseminação de componentes bacterianos pode causar várias doenças extra-orais. Foi demonstrado que os pacientes afetados pela doença periodontal têm maior risco de sofrer

de algum tipo de cancro (Wu, Cen, Kaplan, Zhou, Lux, Shi & He, 2015); especificamente, uma associação positiva entre doença periodontal e cancros orodigestivos (oral, esofágico, gástrico, cólon e pancreático) foi bem estabelecida (Corbella, Veronesi, Galimberti, Weinstein, Fabbro & Francetti, 2018; Fitzpatrick & Katz, 2010), bem como outros tipos de cancro, como mama, próstata e bexiga (Herrero, Fernandes, Verspecht, Ugarte-Berzal, Boon, Proost, Bernaerts et al., 2018; Dizdar, Hayran, Guven, Yılmaz, Taheri, Akman, Bilgin et al., 2017). Uma explicação mais profunda de tais associações e possíveis mecanismos envolvidos nessas associações será abordada nos capítulos seguintes.

A etiologia do cancro é extremamente complexa e bactérias periodontopatogénicas como a *F. nucleatum*, *P. gingivalis*, *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* e a *T. forsythia*, têm suscitado especial interesse na sua etiologia (Nieminen, Listyarifah, Hagström, Haglund, Grenier, Nordström, Uitto et al., 2018). Das espécies bacterianas associadas à periodontite a *P. gingivalis* é a bactéria com maior relação ao cancro orodigestivo (Hoare et al., 2019).

II. Desenvolvimento

1. Mecanismos que apoiam a relação entre bactérias orais e a carcinogénese

Alguns tipos de cancro têm sido associados à relação entre a carcinogénese e a inflamação crónica gerada na cavidade oral conduzindo à concomitante mobilização de mediadores inflamatórios para locais distais no corpo humano (Fitzpatrick & Katz, 2010; Yao, Zhou, Peng, Ji & Liu, 2014), enquanto outros estudos a associaram a um efeito carcinogénico direto mediado por espécies bacterianas associadas à periodontite, diretamente nas células orais ou por migração da cavidade oral (Li, Kolltveit, Tronstad & Olsen, 2000).

Sob certas circunstâncias, o estado homeostático da flora bacteriana oral pode ser perdido, resultando numa "mudança ecológica" ou "disbiose" caracterizada por maior abundância de bactérias patogénicas e expressão de propriedades de virulência (Do, Devine & Marsh, 2013; Zarco, Vess & Ginsburg, 2012). Posteriormente, esses patógenos tornam-se capazes de causar doenças dentro e fora da cavidade oral, revertendo a relação da microbiota oral com o hospedeiro de simbiótica para parasitária (Parahitiyawa, Scully, Leung, Yam, Jin, Samaranayake, 2010). A associação de diferentes microrganismos, em vez de uma espécie, geralmente está envolvida na causa da doença (Darveau, 2010).

Curiosamente, apesar da disseminação natural de bactérias orais devido à deglutição de saliva, que contém um grande número de bactérias, explicando, portanto, o seu envolvimento no trato orodigestivo (Nasidze, Li, Quinque, Tang, & Stoneking, 2009; Socransky & Haffajee, 2015), também há evidências que mostram a sua disseminação através da corrente sanguínea (Brook, 2010). A disseminação sistêmica de bactérias orais após atividades de rotina ou procedimentos odontológicos foi relatada precocemente por Cobe em 1954. Particularmente, a libertação de bactérias anaeróbicas orais para a circulação sanguínea após algumas atividades diárias, como escovar os dentes, passar o fio dentário, durante a mastigação (Tomás, Diz, Tobías, Scully & Donos, 2012), e também imediatamente após procedimentos terapêuticos orais, como o alisamento radicular (Lafaurie, Mayorga-Fayad, Torres, Castillo, Aya, Barón & Hurtado, 2007). Portanto, a cirurgia dentária ou oral é considerada um fator predisponente para

bacteriemia anaeróbica em adultos e crianças (Goldstein, 1996; Finegold, 1977). Essas bacteriemias são geralmente polimicrobianas, com maior número de bacilos Gram-negativos e espécies dos géneros *Peptostreptococcus*, *Clostridium*, *Fusobacterium*, entre outros (Brook, 2010).

Num estudo realizado por Kageyama e colaboradores em 2019, foi examinada a diversidade bacteriana da microbiota salivar em pacientes com diferentes cancros do trato digestivo. A saliva de pacientes com cancro de língua, faringe e esófago demonstrou diversidade bacteriana significativamente maior em comparação com os indivíduos do grupo de controlo. A abundância relativa *Porphyromonas gingivalis* foi significativamente maior em todos os grupos de pacientes com cancro do sistema digestivo. Em pacientes com cancro da língua e faringe, a *F. nucleatum*, *Streptococcus parasanguinis* e espécies de *Neisseria* também foram mais abundantes. Os pacientes com oncologia gástrica exibiram alta abundância relativa correspondente às espécies de *Neisseria* e os pacientes com cancro colorretal apresentaram alta abundância relativa correspondente a *Actinomyces odontolyticus*. É interessante notar que algumas das bactérias eram característica comum entre as várias oncologias, embora as distâncias da cavidade oral de cada variassem.

F. nucleatum (*Fusobacterium nucleatum*) faz parte da microbiota subgingival e está presente na maioria dos indivíduos mantendo o seu equilíbrio saúde/doença, provavelmente atuando como um catalisador metabólico para toda a comunidade. Curiosamente, foram relatadas extensas evidências que associam a bacteriemia causada por *F. nucleatum* com malignidade subjacente (Afra, Laupland, Leal, Lloyd & Gregson, 2013). Particularmente, *F. nucleatum* é considerado um fator de risco para cancro colorretal (CCR) (Gholizadeh, Eslami & Kafil, 2017; Flanagan, Schmid, Ebert, Soucek, Kunicka, Liska, Bruha et al., 2014; Shang & Liu, 2018), uma vez que a bactéria está super-representada em tecidos tumorais colorretais versus tecidos normais em pacientes com CCR (Kostic, Gevers, Pedamallu, Michaud, Duke, Earl, Ojesina et al., 2012; Mima, Nishihara, Qian, Cao, Sukawa, Nowak, Yang et al., 2016); além disso, cargas mais elevadas da bactéria foram encontradas no CCR em comparação com lesões pré-malignas (Flanagan et al., 2014). É importante notar que como a bactéria é encontrada juntamente com outras espécies orais no CCR, como *Parvimonas micra*, *Peptostreptococcus stomatis*, *Gemella morbillorum*, *Porphyromonas* spp, *Leptotrichia* spp. E *Campylobacter*

spp., sugere fortemente que a fonte microbiana é, de facto, a cavidade oral (Warren, Freeman, Pleasance, Watson, Moore, Cochrane, Allen-Vercoe et al., 2013; Drewes, White, Dejea, Fathi, Iyadorai, Vadivelu, Roslani et al., 2017). Mais recentemente, *F. nucleatum* também foi associado a outras neoplasias como cancro oral (Gholizadeh, Eslami & Kafil, 2017), com níveis mais elevados desta espécie encontrados em pacientes com carcinoma epidermóide oral (CEO) em comparação com controles (Hooper, Crean, Fardy, Lewis, Spratt, Wade & Wilson, 2007; Pushalkar, Ji, Li, Estilo, Yegnanarayana, Singh, Li et al., 2012). Semelhante ao CCR, outras bactérias associadas à periodontite, como *Dialister spp.*, *Peptostreptococcus spp.*, *Filifactor spp.*, *Treponema spp.* e *Parvimonas spp.*, também se encontravam exacerbadas nesses tumores (Zhao, Chu, Huang, Yang, Ran, Hu, Zhang et al., 2017). O efeito combinado de tais espécies, torna-se interessante, já que pode contribuir para a transformação celular.

Notavelmente, *P. gingivalis* é a bactéria oral mais comumente associada ao cancro do trato orodigestivo e provavelmente tem um efeito crescente na mortalidade (Atanasova & Yilmaz, 2014; Ahn, Segers & Hayes, 2012). Entre esses cancros, *P. gingivalis* mostra uma forte correlação com Carcinoma oral de células escamosas bem como com o cancro pancreático (Atanasova & Yilmaz, 2014). Esta espécie foi encontrada em tecidos tumorais de pacientes com carcinoma oral das células escamosas (CCE) juntamente com outros anaeróbios orais como, *Veillonella*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Actinomyces* e *Clostridium* (Nagy, Sonkodi, Szöke, Nagy & Newman, 1998), indicando que um efeito combinado de múltiplas espécies bacterianas pode estar envolvido na carcinogénese. Resultados semelhantes foram observados no carcinoma de células escamosas gengival, onde *P. gingivalis* está aumentado em comparação com tecidos normais (Katz, Onate, Pauley, Bhattacharyya & Cha, 2011), provavelmente devido à sua capacidade invasiva. Na verdade, a invasão de tecidos é provavelmente uma das formas mais significativas de disseminação de bactérias orais, uma vez que *F. nucleatum* e *P. gingivalis* - as espécies orais mais associadas aos cancros orodigestivos - invadem os tecidos gengivais e foram encontrados compondo de 15% a 40 % do total de bactérias no tecido gengival obtido de lesões periodontais (Baek, Ji & Choi, 2018). É provável que a ocorrência de ambas as espécies no tecido aconteça como consequência de uma interação íntima entre elas na cavidade oral e provavelmente também em locais extra-orais.

Evidentemente, a presença de uma única bactéria no tecido tumoral não é necessariamente indicativa do seu papel na doença. Uma análise metatranscriptômica recente mostrou que, embora *P. gingivalis* e *F. nucleatum* estivessem ativos em locais de tumor CCE em comparação com locais de tumor de controle saudável, apenas *F. nucleatum* mostrou uma diferença significativa na atividade transcricional (através da análise LEfSe - Linear discriminant analysis Effect Size) (Yost, Stashenko, Choi, Kukuruzinska, Genco, Salama, Weinberg et al., 2018). Isso indica que as diferentes espécies têm um papel em diferentes estágios da tumorigênese ou que as interações próximas entre as espécies microbianas nos tecidos tumorais podem modificar a expressão genética dos companheiros, como foi demonstrado num modelo de comunidade multiespécie in vitro (Kuboniwa, Hendrickson, Xia, Wang, Xie, Hackett & Lamont, 2009; Frias-Lopez & Duran-Pinedo, 2012).

Todas estas informações são relevantes, já que além de *P. gingivalis*, outras bactérias relacionadas à periodontite foram associadas a cânceros orodigestivos. Enquanto que *A. actinomycetemcomitans* (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*) se correlaciona com um aumento do risco de cancro pancreático (Fan, Alekseyenko, Wu, Peters, Jacobs, Gapstur, Purdue et al., 2018) *T. denticola* (*Treponema denticola*) foi detetada tanto no carcinoma de células escamosas da língua (Nieminen, et al., 2018) quanto nos tecidos do cancro esofágico (Narikiyo, et al., 2004).

A questão de como estas espécies interagem entre si na carcinogénese não foi totalmente compreendida. Não foi elucidado como as bactérias orais migratórias afetam o microbioma local em sítios distais e, portanto, alteram as respostas das células hospedeiras. Embora os mecanismos envolvidos no desenvolvimento do cancro por bactérias periodontopatogénicas não esteja completamente elucidado, sabe-se que a inflamação local provocada por estas bactérias leva a alterações celulares (Hoare et al., 2019).

Entre todas as espécies periodontopatogénicas encontradas em tecidos tumorais só existe informação sobre a potencial ação carcinogénica de algumas delas (Hoare et al., 2019).

Zhang e colaboradores (2018) sugerem três mecanismos de ação da microbiota oral na patogenidade do cancro (Figura 1). A primeira é a estimulação bacteriana da inflamação crónica. Mediadores inflamatórios produzidos neste processo causam ou facilitam a proliferação celular, mutagénese, ativação oncogénica e a angiogénese. Em relação ao segundo mecanismo, as bactérias podem influenciar a patogenidade do cancro ao afetarem a proliferação celular, rearranjos do citoesqueleto, ativação de NF- κ B, e inibição da apoptose celular. O terceiro mecanismo passa pela produção, por bactérias, de substâncias que podem ser carcinogénicas (Zhang, Wang, Li, Ni, Du & Yan, 2018).

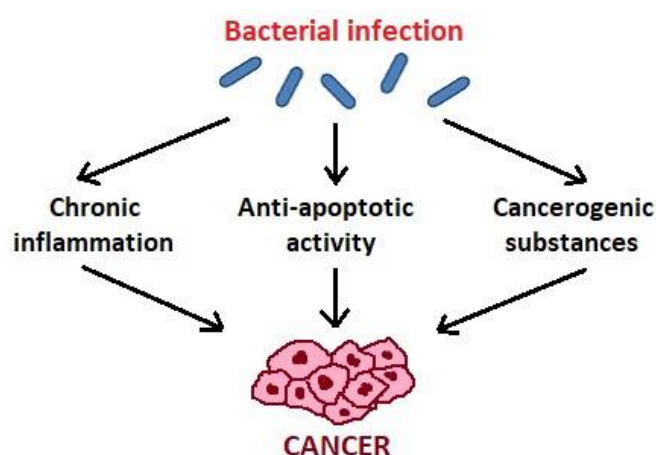


Fig. 1. A influência das bactérias orais na patogénese do cancro. (Adaptado de Karpiński, 2019)

1.1. *Porphyromonas Gingivalis*

Porphyromonas gingivalis (*P. gingivalis*), é uma das várias espécies bacterianas da cavidade oral, é uma bactéria anaeróbia gram-negativa (Haffajee, 1994) e está altamente associada à doença periodontal (Dzink, 1988). Recentemente, vários graus de associações entre *P. gingivalis* e cancros do sistema digestivo, incluindo carcinoma de células escamosas oral na cavidade oral, carcinoma escamoso esofágico no trato digestivo e cancro pancreático, foram exibidos em vários estudos clínicos e experimentais.

A correlação entre a mortalidade por oncologias orodigestivas e *P. gingivalis* foi primeiramente ilustrada num estudo de coorte de Ahn et al (2012), que identificou que *P. gingivalis* também atuaria como um marcador microbiano cheio de valor em tais carcinomas.

É importante notar também que o ADN genómico (ADNg) de *P. gingivalis* foi detetado em níveis elevados em patologias oncológicas do trato digestivo superior, incluindo no cancro do esófago (Yuan, Liu, Kong, Gu, Qi, Wang, Sun, et al., 2017). Além disso, *P. gingivalis* foi mais abundante na saliva de pacientes com cânceros do trato digestivo, especialmente cancro de língua, faringe e esófago.

A presença prolongada de *P. gingivalis* na cavidade oral pode infectar células epiteliais gengivais, interromper o ciclo celular e as respostas imunológicas do hospedeiro, bem como a apoptose celular. A apoptose é um processo altamente regulado de deleção celular que está envolvido no desenvolvimento, diferenciação, homeostase e regulação da função imunológica. A disfunção ou desregulação do programa apoptótico está envolvida numa variedade de condições patológicas, incluindo doenças autoimunes e cancro (Fadeel & Orrenius, 2005).

1.1.1. Atividade Anti-apoptótica

Geralmente, a apoptose mantém a integridade dos tecidos e órgãos normais em resposta a danos no ADN (Ácido Desoxirribonucleico), stress celular ou expressão de oncogenes pela erradicação das células danificadas, bloqueando assim o crescimento do tumor (Croce, 2008; Nikolettópoulou, Markaki, Palikaras & Tavernarakis, 2013). Também é necessário para manter a homeostase do tecido e controlar as funções do sistema imunológico (Adams & Cory, 2007).

Porphyromonas gingivalis atua antiapoptoticamente por meio da modulação de várias vias (Gholizadeh, Eslami, Yousefi & ET, 2016).

Existem duas principais vias apoptóticas que operam por meio da ativação de uma família de proteases de cisteína chamadas caspases: a via mediada por mitocôndrias ou

intrínseca (Fig. 2); e a morte mediada por recetor [por exemplo, recetor do fator de necrose tumoral (TNF) e Fas] ou via extrínseca (Hail, Carter, Konopleva & Andreeff, 2006). A via intrínseca da apoptose mitocondrial é afetada através da ativação da via de sinalização JaK1/Akt/STAT3 (Janus Kinase 1/Proteína quinase B/Signal transducer and activator of transcription 3) (Hoare et al., 2019; Whitmore & Lamont, 2014). Ativa também a via do P13K/AKT, inibe a libertação de citocromo c e redução da expressão de proteínas pró-apoptóticas (Hoare et al., 2019).

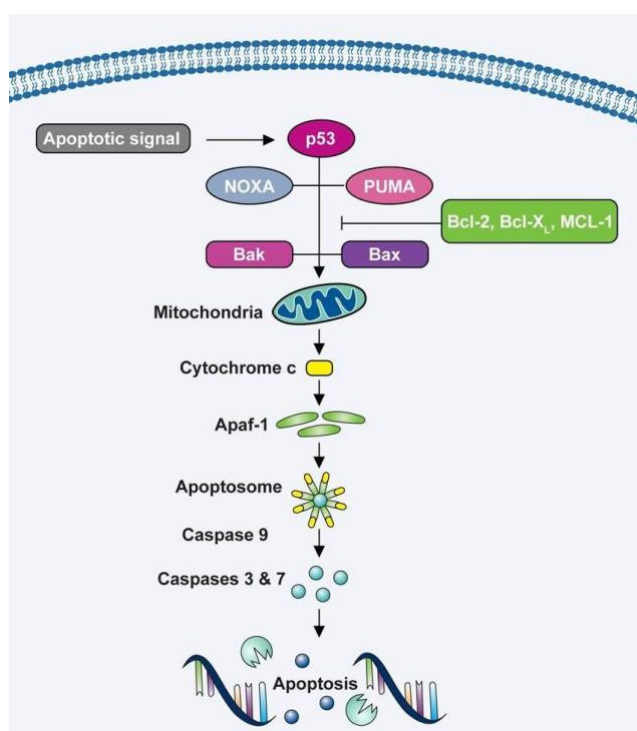


Fig. 2. Via mitocondrial da apoptose. Apaf-1, fator de ativação de protease associada à apoptose 1; Bak, assassino de antagonista homólogo de Bcl-2; Bax, proteína X associada a Bcl-2; Bcl-2, linfoma 2 de células B; Bcl-xL, linfoma Bcl-2 extra grande; Mcl-1, leucemia de células mieloides 1; PUMA, modulador de apoptose regulado positivamente por p53.

(Adaptado de <http://www.bioncology.com/research-education/apoptosis/>).

A infecção de células epiteliais por *P. gingivalis* intracelular resulta na fosforilação de JAK1 (Janus Kinase 1) e STAT3. A via JAK-Stat transmite sinais polipeptídicos extracelulares, frequentemente citocinas, diretamente para os promotores do gene alvo (Aaronson & Horvath, 2002). Os JAKs são ativados por autofosforilação e posteriormente ativam Stats por fosforilação da tirosina. Este fenómeno está associado à

regulação positiva dos genes de anti-apoptose Bcl-2 (linfoma 2 de células B), Bfl-1 (Bcl-2-related protein A1) e Survirina (Handfield, Mans, Zheng, Lopez, Mao, Progilske-Fox, Narasimhan, et al., 2005) e à regulação negativa do gene da pró-apoptose Bax (proteína X associada a Bcl-2) (Nakhjiri, Park, Yilmaz, Chung, Watanabe, El-Sabaeny, Park et al., 2001). Todos esses genes estão envolvidos no controle da permeabilidade mitocondrial. Consistente com estas respostas transcricionais, *P. gingivalis* ativa a pró-sobrevivência fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/via Akt e bloqueia a despolarização da membrana mitocondrial, a liberação do citocromo c (Yilmaz, Jungas, Verbeke & Ojcius, 2004) e, por sua vez, a ativação da cascata das caspases a jusante. Portanto, a atividade anti-apoptótica primária de *P. gingivalis* é através da modulação das vias intrínsecas da morte celular. Esta falha no mecanismo celular, causada por *P. gingivalis*, e ativação do mecanismo anti-apoptótico, dá início à proliferação anormal das células como é característico nas patologias oncológicas.

No que respeita à supressão da apoptose, *P. gingivalis* também atua ao acelerar a progressão da fase S do ciclo celular ao manipular a atividade da ciclina/CDK (cinase dependente da ciclina) e reduzindo o nível do supressor tumoral p53 (proteína supressora de tumor) (Kuboniwa, Hasegawa, et al., 2008). As ciclinas são proteínas nucleares que são expressas transitoriamente para ativar CDK's (Bloom & Cross, 2007). As ciclinas e os CDK's formam complexos que proporcionam a progressão do ciclo celular. A expressão da ciclina A, essencial para o controle do ciclo celular nas transições G1/S (início) e G2/M (mitose), é aumentada por *P. gingivalis*. Além disso, CDK2, que mostra atividade máxima durante as fases S e G2 (Malumbres & Barbacid, 2005), embora reduzido em quantidade, é ativado pela fosforilação de um resíduo de treonina (Thr160). Segundo um estudo realizado por Kuboniwa e colaboradores (2008), os níveis de CDK4 e CDK6, que regulam a transição G1/S, revelam-se elevados nas células infetadas, enquanto que foram diminuídos os níveis de INK4 (inibidor CDK4/6) que induz a interrupção do ciclo celular nas fases G1 e G2. A ciclina D, que regula a progressão através de G1, foi reduzida após a infeção por *P. gingivalis*.

A infeção de GEC (células epiteliais gengivais) com *P. gingivalis* resultou numa redução dos níveis de p53. O p53 é um supressor de tumor que desempenha um papel

importante na resposta celular ao dano do ADN e outras aberrações genómicas, a sua ativação pode levar à interrupção do ciclo celular e reparação do ADN ou à apoptose (Vousden, 2006). O p53 é estabilizado e ativado por fosforilação em vários locais através da ação de quinases como Chk2, Aurora A, CK1delta (Casein kinase 1 delta) e CK1epsilon (Casein kinase 1 epsilon) (Knippschild, Milne, Campbell, Maggio, Christenson, Hoekstra & Meek, 1997). Todas essas quinases foram reguladas negativamente por *P. gingivalis*, e o p53 restante foi subfosforilado em Ser392 (Invitrogen Anti-Phospho-p53) em células infetadas em comparação com controles não infetados. Assim, tanto o nível quanto a atividade de p53 são diminuídos por *P. gingivalis*, congruente com o aumento da taxa de proliferação de GEC infetado.

MicroRNAs (miRNAs) são moléculas de ARN (Ácido Ribonucleico) pequenas (20–23 nts) e não codificantes que influenciam negativamente a expressão genética ao se ligar a ARNm's (ARN mensageiros) e, assim, promover a degradação do ARNm alvo ou bloquear sua tradução em proteína. Dessa forma, atuam como reguladores-chave de uma ampla variedade de mecanismos celulares e processos fisiológicos, como progressão do ciclo celular, divisão celular, apoptose e necroptose. Estudos recentes demonstraram que numerosos miRNAs podem afetar fortemente a expressão de genes pró e anti-apoptóticos, oncogenes, genes relacionados com a necroptose (Li, Hashimi, Good, Cao, Duan, Plummer, Mellick et al., 2012).

A *P. gingivalis* modula a expressão de microRNAs (miRs), nas células epiteliais. A regulação positiva de miR-203 (Micro ácido ribonucleico 203) leva à inibição direta o supressor de sinalização de citocina 3 (SOCS3). SOCS3 pode desempenhar um papel de inibição da sinalização JAK/STAT3, reduz a liberação de citocromo c e bloqueia a ativação da caspase-9 e caspase-3 que se correlacionam positivamente com a apoptose (Zhou & Luo, 2019). Esses resultados sugerem um papel do miRNA na patogénese de *P. gingivalis*, contribuindo para a modulação das respostas imunes das células hospedeiras e facilitando a persistência bacteriana (Moffatt & Lamont, 2011).

A infeção por *P. gingivalis* induz a expressão do recetor B7-H1 (recetor da família B7 homólogo 1) que pertence à família B7 e desempenha um papel regulador significativo na reação imunológica (Dong, Zhu, Tamada & Chen, 1999; Freeman, Long,

Iwai, Bourque, Chernova, Nishimura, Fitz, et al., 2000), sugerindo que este patógeno está envolvido na transferência para o distante e avanço da gradação nuclear de células de carcinoma (Groeger, Domann, Gonzales, Chakraborty & Meyle, 2011). Por outro lado, o sinal coestimulatório mediado pelos receptores B7-H1 pode motivar a inatividade e o efeito apoptótico dessas células T ativadas, que subsequentemente conduz à evasão imunológica (Dong, Strome, Salomao, Tamura, Hirano, Flies, Roche, et al., 2001).

Extracelularmente, a *P. gingivalis* também pode inibir a apoptose de células epiteliais gengivais induzida pela ligação de ATP (Trifosfato de Adenosina) do subtipo recetor purinérgico P2X7, que desempenha um papel crítico na promoção do crescimento celular, neovascularização, metástase e secreção de citocinas inflamatórias. Esta bactéria mostrou competência para secretar a enzima anti-apoptótica, Nucleosídeo Difosfato Quinase (NDK) que catalisa a transferência de ortofosfatos de trifosfatos de nucleosídeo (ATP), para difosfatos de nucleosídeo (ADP). Consequentemente, o patógeno inibe a ativação dependente de ATP do recetor P2X7 e, assim, reduz a produção de interleucina-1 β e promove a tumorigénese. NDK também fosforila a proteína de choque térmico 27 (HSP27); a fosforilação de HSP27 e inativação do recetor P2X7 inibem a apoptose.

A secreção de NDK por *P. gingivalis* pode modular adicionalmente as espécies reativas de oxigénio (ROS) induzidas por ATP e mitocondriais, bem como a resposta antioxidante da glutathione gerada através do interatoma P2X7/NADPH-oxidase (Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina) (Choi, Spooner, DeGuzman, Koutouzis, Ojcius & Yilmaz, 2013). ROS pode servir como um mediador chave na ativação de fatores de transcrição associados à inflamação e desenvolvimento de cancro (Spooner & Yilmaz, 2011). Além disso, *P. gingivalis* produz cisteína proteinases denominadas gingipains, que podem clivar a pró-enzima MMP-9 (Metaloproteinases da Matriz 9), transformando-a na sua forma ativa madura. Este processo é dependente de NF- κ B. A ativação de MMP-9 por gingipains causa degradação da estrutura da membrana basal, que promove a migração e invasão das células do carcinoma (Inaba, Sugita, Kuboniwa, Iwai, Hamada, Noda, Morisaki, et al., 2014).

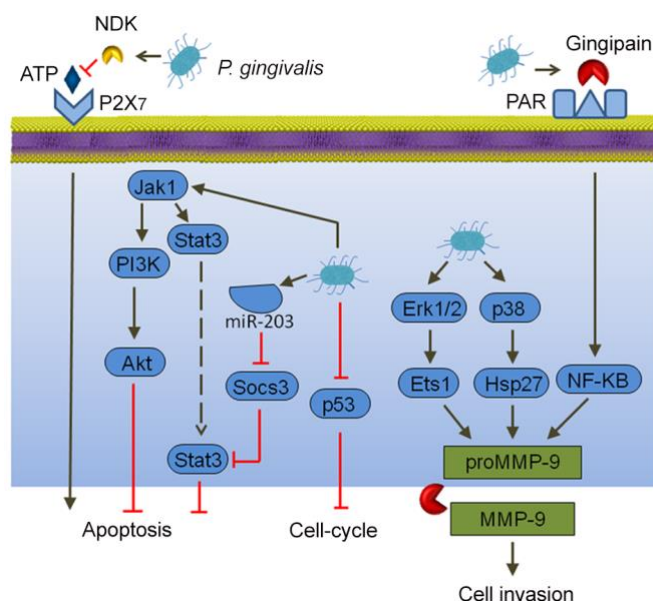


Fig. 3. Interações entre *P. gingivalis* e células epiteliais que podem produzir um fenótipo oncogénico. *P. gingivalis* extracelular secretam gingipains, que ativam o Recetor Ativado por Protease (PAR) levando à produção de metaloprotease de promatríz (MMP)-9, e também convertem proMMP-9 em MMP-9 maduro, junto com nucleosídeo difosfato quinase (NDK) que cliva ATP e impede a ativação do recetor P2X7 proapoptótico. O *P. gingivalis* intracelular ativa a sinalização Jak-Stat antiapoptótica e inibe a expressão do supressor de tumor p53. Além disso, Erk 1/2 e p38 são ativados, o que também eleva a expressão de proMMP-9.

(Adaptado de Whitmore & Lamont, 2014).

1.1.2. Processo de Inflamação Crónica

A inflamação crónica tem sido proposta como um dos mecanismos pautativos pelos quais as bactérias orais contribuem para a carcinogénese e o seu desenvolvimento (Hooper, Wilson & Crean, 2009).

A exposição a *P. gingivalis* induziu a produção de várias citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas por células epiteliais orais, incluindo a IL-1 β (Interleucina-1 β), IL-6 (Interleucina-6), IL-17 (Interleucina-17), IL-23 (Interleucina-23), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e metaloproteinases de matriz MMP-8 (Metaloproteinases da Matriz 8) e MMP-9 (Szkardkiewicz & Karpinski, 2013).

Diferentes vias de sinalização estão envolvidas na liberação desses mediadores inflamatórios. Por exemplo, *P. gingivalis* não desencadeou apenas as vias de sinalização MAPK (Mitogen-activated protein kinase) e NF- κ B para induzir a produção de IL-8

(Interleucina-8), mas também ativou o eixo JAK/c-Jun para elevar os níveis de IL-1 β e IL-6 (Fujita, Nakayama, Naito, Yamachika, Inoue, Nakayama, Iida et al., 2014; Wang, Zhou, Duan, Jotwani, Vuddaraju, Liang, Scott et al., 2014). Karpinski (2019) sugeriu que esses mediadores inflamatórios poderiam induzir ou facilitar a proliferação celular, mutagênese, ativação de oncogene e angiogênese. Sun et al. (2016) indicaram que a inflamação crônica pode induzir a imunossupressão, contribuindo assim para o desenvolvimento de cancro (Sun, Liu, Guan, Wu, Sun & Zeng, 2016).

A IL-1 β , estimula a liberação de fosfolipase A2, prostaglandinas (PG), proteínas de fase aguda, bem como citocina pró-inflamatória IL-6, fator de necrose tumoral (TNF), e várias metaloproteinases (MMPs) (Hou, Liu, Liu, Lin, Liao & Rossomando, 2003; Konopka & Brzezinska-Błaszczyk, 2010). Ativa ainda as células endoteliais para produção do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e outros fatores pró-angiogênicos (por exemplo, TNF) que providencia um microambiente inflamatório para a angiogênese e progressão tumoral (Carmi, Dotan, Rider, Kaplanov, White, Baron, Abutbul, et al., 2013). Alto conteúdo de IL-1 β está associado à capacidade de invasão do tumor, migração e fenótipo tumoral mais agressivo (Jin, Yuan, Fuchs, Yao, Joseph, Schwall, Schnitt et al., 1997; Voronov, Shouval, Krelin, Cagnano, Benharroch, Iwakura, Dinarello et al., 2003). MMP-9 libertado por esta citocina, desempenha um papel na degradação extracelular da matriz e na invasão tumoral, além de induzir a migração, importante na transição de um estado benigno para um estado invasivo.

Outra importante citocina pró-inflamatória é a IL-6. Esta é produzida por várias células periodontais em resposta à estimulação sob a influência de LPS (lipopolissacarídeo) e citocinas pró-inflamatórias e TNF. IL-6 induz a reabsorção óssea e estimula a síntese de proteínas de fase aguda, quimiocinas e PGE2 (prostaglandina E2) (Ishimi, Miyaura & Jin, 1990; Gabay, 2006). A IL-6 induz o stresse oxidativo e pode levar a um acúmulo transitório de H₂O₂ na mitocôndria e, conseqüentemente, ao dano mitocondrial (Mathy-Hartert, Hogge, Sanchez, Debu-Dupont, Crielaard & Henrotin, 2008; Murata, Thanan, Ma & Kawanishi, 2012). A IL-6 também afeta o processo de invasão e metástase, aumentando a expressão das metaloproteinases da matriz (MMPs) (Kossakowska, Edwards, Prusinkiewicz, Zhang, Guo, Urbanski, Grogan, Marquez et al., 1999). Além disso, esta citocina regula positivamente a expressão de várias moléculas de adesão intracelular (ICAMs) e moléculas de adesão de leucócitos endoteliais (ELAMs),

que causam a adesão das células tumorais às células endoteliais e, portanto, têm um impacto na disseminação dos tumores (Natali, Nicotra & Cavaliere, 1990). A maioria dos genes que são direcionados pela IL-6 estão envolvidos na progressão do ciclo celular e na supressão da apoptose. Ao influenciar as vias antiapoptóticas, a IL-6 pode ter um impacto no desenvolvimento do cancro (Haura, Turkson & Jove, 2005).

Além disso, uma das principais citocinas da resposta inflamatória é o TNF- α . Esta citocina é sintetizada, entre outros, por monócitos/macrófagos, neutrófilos, fibroblastos, linfócitos e mastócitos. Esta é secretada em resposta a muitos fatores, incluindo as LPS bacterianas. O TNF- α (Fator de Necrose Tumoral alfa) induz fortemente a produção de compostos reativos de oxigênio, leucotrienos, prostaglandinas e metaloproteinases (Bradley, 2008). O TNF leva a uma redução no número de células osteogênicas e fibroblastos (Kurtis, Tüter, Serdar, Akdemir, Uygur, Firatli & Bal, 2005). Em contraste com altas doses de TNF- α , que estão relacionadas à destruição do tumor, a exposição a baixas doses dessa molécula está relacionada à promoção do tumor (Szlosarek & Charles, 2006). A ativação de vias de sinalização oncogênicas em células epiteliais, incluindo Wnt (Wingless-related integration site) e NF- κ B, é crítica para o crescimento tumoral induzido por TNF- α (Rivas, Carnevale, Proietti, Rosemblyt, Beguelin, Salatino, Charreau, Frahm, Sapia, Brouckaert, Elizalde & Schillaci, 2008).

Presentes na membrana externa de *P. Gingivalis*, os lipopolissacarídeos participam na inibição da apoptose e indução da proliferação, efeito associado ao aumento da expressão de TLR4 (Recetor Toll-like 4) (Hoare et al., 2019). Os LPS são capazes de regular a expressão genética de citocinas pró-inflamatórias por meio da ativação do receptor toll-like 4 via NF- κ B (Fator Nuclear kappa B) (Yang, Francois & Pei, 2012). O LPS-G (Lipopolissacarídeo G) lidera a ativação do complexo TLR4/MyD88 (Recetor Toll-like 4/Resposta primária da diferenciação mielóide 88), desencadeando a secreção de citocinas pró-inflamatórias como: IL-1 α (Interleucina-1alfa), IL-8, TNF- α e β e EOTAXINA. Além disso, a regulação positiva das vias de sinalização pERK/ERK (Extracellular signal- regulated protein kinases/Extracellular signal-regulated kinases) e translocação nuclear NF κ B. Membros da família dos receptores Toll-like (TLR) desempenham papéis importantes nas respostas imunes inatas e adaptativas. As proteínas TLR permitem que o hospedeiro reconheça um grande número de padrões moleculares

associados a patógenos, como lipopolissacarídeos bacterianos, ARN viral, ADN contendo CpG e flagelina, entre outros.

Além disso, os agentes patogênicos periodontais podem estimular a tumorigênese via interação direta com células epiteliais orais cancerosas e pré-cancerosas, por meio da ativação de receptores Toll-like epiteliais. *P.gingivalis* pode induzir inflamação crônica e ativar, via LPS, a resposta imune inata por meio de TLR2 (Recetor Toll-like 2) e TLR4 (Hayashi, Gudino, Gibson & Genco, 2010). Além disso, foi demonstrado que os TLRs inibem a apoptose e promovem o crescimento do tumor e a angiogênese (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2009).

Por último, *P. gingivalis*, como demonstrado anteriormente, é promotor de infecções crônicas persistentes dentro das células epiteliais (Han & Wang, 2013). A inflamação crônica está intimamente ligada ao desenvolvimento de cancro pela libertação de fatores inflamatórios, como IL-6 e IL-8, o primeiro, causa hipometilação do ADN e tumorigênese, e o último inibe os níveis de MMPs e faz conexões com a invasão de células tumorais (Zhou & Luo, 2019).

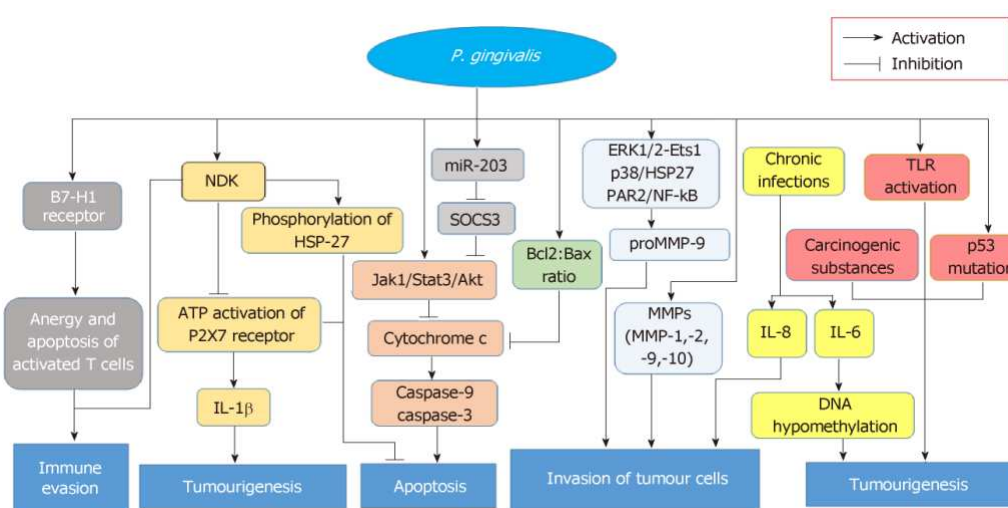


Fig. 4. Possíveis mecanismos que conduzem ao cancro causados por *Porphyromonas gingivalis*.
(Adaptado de Zhou & Luo, 2019).

1.1.3. Aumento da invasão celular

A transição epitelial-mesenquimal (EMT) é caracterizada pela perda de adesão

intercelular e polaridade em células epiteliais complementada com a aquisição de potencial invasivo e metastático (Chaw, Majeed, Dalley, Chan, Stein & Farah, 2012). Lee et al. (2017) indicaram que a sinalização EMT induzida por *P. gingivalis* pode apoiar o seu papel etiológico no desenvolvimento de cancro (Lee, Roberts, Atanasova, Chowdhury, Han & Yilmaz, 2017). *P. gingivalis* iniciou EMT ou EMT parcial em células epiteliais orais humanas (Sztukowska, Ojo, Ahmed, Carenbauer, Wang, Shumway, Jenkinson et al., 2016; Lee, et al., 2017; Abdulkareem, Shelton, Landini, Cooper & Milward., 2018).

A infecção de células epiteliais orais por *P. gingivalis* promoveu a ativação da via de sinalização PI3K/Akt e a superexpressão de fatores de transcrição indutores de EMT Snail e Slug, o que resultou na perda de caderina-E e sequestro nucleo-citoplasmático de β -catenina (Lee et al., 2017). Essas alterações moleculares induziram a expressão de Zeb1, Vimentina e metaloproteinase de matriz (MMP) -2, 7 e 9, que podem aumentar a progressão e invasão tumoral (Lee, et al., 2017).

As MMPs desempenham um papel crítico na degradação das membranas basais e da matriz extracelular, facilitando a migração e invasão das células cancerígenas (Inaba et al., 2014).

Alguns estudos mostraram que a exposição a *P. gingivalis* promoveu a invasão de células cancerígenas orais (Inaba, et al., 2014; Cho, Jung, Kim, Woo, Jung, Lee, Choi et al., 2018). O grupo de Park confirmou que a infecção por *P. gingivalis* regulou positivamente a liberação de IL-8 e a libertação de MMPs dependentes de IL-8 (Cho et al., 2018); Ha, Park, Woo, Kim, Coi, Park, Kim, et al., 2016). Além disso, *P. gingivalis* estimulou as vias ERK1/2-Ets1, p38/HSP27 e PAR2/NF- κ B (receptor ativado por protease do tipo 2/Factor Nuclear kappa B) para induzir a expressão de proMMP-9 (Pro metaloproteinases de matiz 9) e a sua ativação para MMP-9, resultando em invasão celular (Inaba et al., 2014). Além disso, Inaba et al. (2015) mostraram que a expressão de PAR4 (Recetor ativado por proteases tipo 4) induzida por *P. gingivalis* promoveu a fosforilação de p38 e ERK1/2, levando à superexpressão de MMP-9 e aumento da invasão

celular em células SAS OSCC (Carcinoma Oral das Células Escamosas) (Inaba, Amano, Lamont & Murakami, 2015).

A *P. gingivalis* extracelular produz gingipaina, que ativa o Recetor Ativado por Protease (PAR), levando à produção de metaloproteinases MMP-9 e conversão de proMMP-9 em MMP-9. Cujas atividades enzimáticas são controladas pelos seus inibidores endógenos, isto é, α -2-macroglobulina e inibidores teciduais de metaloproteinases derivadas da matriz (TIMP). MMP-2 e MMP-9 são as mais ativas. Estas são produzidas por células cancerígenas, mas a MMP-9 também é produzida por neutrófilos. Eles perdem as suas funções fisiológicas quando o equilíbrio entre a atividade de MMP-2, MMP-9 e a expressão de seus inibidores de TIMP-2 (inibidores teciduais de metaloproteinases derivadas da matriz 2) e TIMP-1 (inibidores teciduais de metaloproteinases derivadas da matriz 1) é perturbado. Nesse caso, a sua ação está associada à destruição da membrana basal e dos componentes da matriz extracelular, como fibronectina, laminina, colagénio e proteoglicanos. Como resultado da deterioração da barreira, as células tumorais deixam o lúmen do vaso, ampliando a invasão celular. Devido à migração das células tumorais, desenvolvem-se as metástases (Chojnacki, Zajac & Pięt, 2017; Trojanek, 2012). Além disso, a MMP-9 afeta significativamente a atividade de citocinas e quimiocinas. A capacidade de degradação por quimiocinas desempenha um papel especial no processo oncológico. As quimiocinas inativadoras da MMP-9 produzidas pelas células cancerígenas inibem a entrada de neutrófilos no local da inflamação e, consequentemente, ao desenvolvimento de cancro (Chojnacki et al., 2017; Kołaczowska, 2010). Por outro lado, ao ativar as vias de sinalização ERK1/2-Ets1, p38/HSP27 e PAR2/NF- κ B, *P. gingivalis*, induz a expressão de proMMP-9, e consequentemente, promove a invasão de células tumorais.

Além disso, o TNF- α possui a capacidade de induzir danos ao ADN pela produção de espécies reativas de oxigénio (Yan, Wang, Rabbani, Zhao, Li, Yuan, Li et al., 2006). Foi demonstrado que o TNF- α influencia os processos de motilidade e invasão pela indução da expressão de MMPs (Leber & Balkwill, 1998) e simulação da produção de vários fatores angiogénicos, como interleucina-8, VEGF e fator de crescimento de fibroblastos básico (FCFb) (Yoshida, Ono, Shono, Izumi, Ishibashi, Suzuki & Kuwano,

1997).

P. gingivalis positivo para FimA (Fimbrilina A) iniciou uma EMT parcial dependente de Zeb1 em células epiteliais gengivais com expressão aumentada de Vimentina e MMP-9 (Sztukowska, et al., 2016). De acordo com um estudo realizado no Japão por Amano e colaboradores (2004), *P. gingivalis* produz dois tipos de fimbriae: um consiste numa proteína codificada pelo gene fimA, a outra da proteína codificada pelo gene mfal. Foram encontrados seis genótipos FimA, dos quais o genótipo FimA II e FimA IV são os mais comuns em pacientes com periodontite, enquanto que em pacientes saudáveis o genótipo FimA I é mais frequentemente observado (Amano, Nakagawa, Okahashi & Hamada, 2004; Moreno & Contreras, 2013). Apesar das suas diferenças, estas executam as mesmas funções, ou seja, participam na invasão inicial, permitindo que *P. gingivalis* adira à membrana externa do hospedeiro através da sua adesão à integrina celular Alpha-5 beta-1. Como resultado, estas bactérias são mais facilmente absorvidas pelos fagócitos e células dendríticas do hospedeiro o que origina a ausência de vigilância imunológica pelo hospedeiro às mesmas (Amano, et al., 2004). Notavelmente, *P. gingivalis* deficiente em fimbrilina A (fimA) exibiu capacidades reduzidas de proliferação, migração, invasão e invasão intracelular e diminuição da fosforilação de Smad2/3 em comparação com *P. gingivalis* de tipo “selvagem”, indicando que a FimA contribuiu parcialmente para o papel promotor de tumores de *P. gingivalis* através da sinalização de TGF β /Smad (Fator de crescimento transformante beta/Smad) (Qi et al., 2020).

1.2. *Fusobacterium Nucleatum*

Fusobacterium spp são bastonetes anaeróbios, gram-negativos, finos com extremidades afiladas (fusiformes) e são um componente importante da microbiota oral, bem como do trato gastrointestinal, do trato respiratório superior e dos órgãos genitais (Brook, 2013).

F. nucleatum é a espécie mais comumente isolada em amostras clínicas e está frequentemente associada à doença periodontal, apendicite, doença inflamatória

intestinal, infecções do trato respiratório, artrite reumatóide, doença cardiovascular, corioamnionite, parto prematuro, natimorto, doença de Alzheimer e síndrome de Lemierre (Allen- Vercoe, Strauss, & Chadee, 2011; Brook, 2013; Han, 2015).

A *F. nucleatum* apresenta três mecanismos associados à promoção de cancro (Hoare et al., 2019).

O mecanismo da adesina FadA, que se liga à E-caderina de células cancerígenas e ativa a sinalização das B-cateninas levando ao aumento da atividade transcripcional dos oncogenes, das citocinas pró-inflamatórias, ativação das vias pró-carcinogénicas e proliferação das células cancerígenas (Figura 5) (Hoare et al., 2019; Whitmore & Lamont, 2014). FadA é um fator de virulência chave de *F. nucleatum* e altera a infiltração de macrófagos e metilação do inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A) promotor de lesões cancerígenas (Park, Kim, Cho, Lee & Kang, 2017). *F. nucleatum* também pode ativar a sinalização de β -catenina por meio de seu LPS. Neste processo, o aumento da expressão de β -catenina, e oncogenes C-myc e ciclina D1, é observado (Chen, Peng, Yu, Chen, Wu, Shi, Li et al., 2017; Wu, Wu, Chen, Li, Peng, Li, Tang et al., 2018).

O mecanismo do LPS produzido pelo *F. nucleatum* induz a produção de citocinas inflamatórias nos tecidos gengivais e nos tecidos do colon tais como IL-6, IL-12 (Interleucina-12), IL-17 e TNF- α (Hoare et al., 2019). Estas estão envolvidas no controlo celular e vão aumentar a migração e proliferação celular (Whitmore & Lamont, 2014).

O mecanismo da Fap2 diminui a citotoxicidade das células imunitárias favorecendo a progressão das células cancerígenas (Figura 5) (Hoare et al., 2019). A inibição da citotoxicidade das células natural killer (NK) e da atividade das células T também foi observada por meio da interação direta da proteína Fap2 com a imunoglobulina das células T e o domínio ITIM (Motivo de inibição baseado em tirosina) (TIGIT) (Gur, Ibrahim, Isaacson, Yamin, Abed, Gamliel, Enk et al., 2015). A proteína imunossupressora de *F. Nucleatum* pode inibir as respostas das células T humanas mediando a interrupção do ciclo celular G0/G1, resultando em um ambiente de imunossupressão local ou sistêmica (Shenker & Datar, 1995). *F. nucleatum* está, assim,

associado a altos níveis de citocinas o que origina um microambiente inflamatório que apoia a progressão do tumor (Kostic, Chun, Robertson, Glickman, Gallini, Michaud, Clancy et al., 2013; McCoy, Araujo-Perez, Azcarate-Peril, Yeh, Sandler & Keku, 2013).

O aumento da sobrevivência e migração celular por *F. nucleatum* é outro possível mecanismo que leva à carcinogênese. A cinase dependente de ciclina (CDK) 7 e 9 mediada por *F. nucleatum* promove a proliferação celular em células epiteliais humanas (Uitto, Baillie, Wu, Gendron, Grenier, Putnins, Kanervo et al., 2005). A exposição ao *F. nucleatum* ativa a via do sinal p38 nas células epiteliais e, subsequentemente, estimula a produção de MMP-9 e MMP-13 (Metaloproteinases da Matriz 13), que desempenham papéis importantes na invasão tumoral e metástase ((Uitto et al, 2005; Whitmore & Lamont, 2014). Mahtout et al. utilizaram ensaios imunológicos e imunoenzimáticos para mostrar que a interação de *F. nucleatum* com CD46 (Proteína do Coeficiente de Membrana) regulou positivamente a expressão de MMP-9 em células epiteliais orais (Mahtout, Chandad, Rojo, Grenier, 2011).

Para além destas aumenta ainda a proliferação e capacidade de invasão das células epiteliais promovendo EMT, ativando a sinalização pela NF- κ B e aumentando a produção de IL-6, IL-1 β (Hoare et al., 2019; Whitmore & Lamont, 2014).

Além disso, *F. nucleatum* também pode reduzir a quantidade de células sanguíneas mononucleares periféricas (PMBCs) e neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) induzindo a apoptose celular (Jewett, Hume, et al., 2000). Portanto, é concluído que *F. nucleatum* pode promover o desenvolvimento de cancro por meio de inflamação crónica, aumento da sobrevivência e invasão celular e supressão imunológica, mas o seu papel exato merece investigação adicional.

A interação entre *Fusobacterium nucleatum* e as células epiteliais, que podem afetar o desenvolvimento do fenótipo oncogénico, são apresentados na Figura 5.

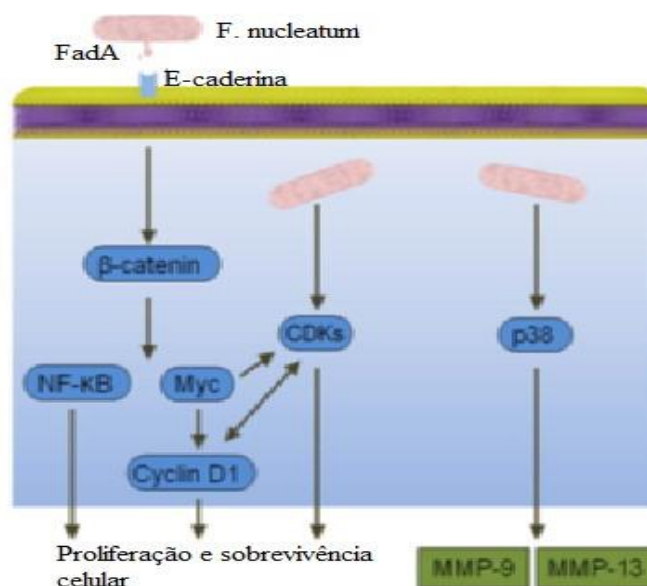


Fig. 5. Mecanismos de interação entre a *F. nucleatum* e as células epiteliais que podem produzir um fenótipo oncogénico.

(Adaptado de Whitmore & Lamont, 2014).

1.3. *Treponema denticola*

A *Treponema denticola* (*T. denticola*) é uma espiroqueta anaeróbia obrigatória, bem caracterizada e frequentemente isolada, que apresenta propriedades altamente invasivas (Nieminen et al., 2018). Foi demonstrado que *T. denticola* possui várias propriedades, como motilidade, atividade proteolítica, aderência a células epiteliais, citotoxicidade, indução de reabsorção óssea, bem como modulação de respostas imunes (Makinen, Makinen, Syed, 1992; Shin & Choi, 2010). Tem sido visto como um dos patógenos periodontais mais bem definidos e a espiroqueta mais comum associada à periodontite (Nieminen, et al., 2018; Simonson, Goodman, Bial & Morton, 1998). Esta bactéria foi recentemente detetada em tumores orodigestivos incluindo tumores da língua, esófago, amígdalas e OSCC (Hoare et al., 2019).

Um dos principais fatores de virulência associado à *T. denticola* é a presença de uma proteinase semelhante a quimiotripsina (Td-(CTLP)). A Td-(CTLP) intervém na degradação de proteínas do hospedeiro, hidrolisa péptidos bioativos, contribui na entrada da *T. denticola* no epitélio e melhora a integração da *T. denticola* no biofilme bacteriano. Além destas funções possui características modeladoras do sistema imunitário, inflamatório e é capaz de conduzir vários tipos de células à apoptose (Nieminen et al.,

2018). A CTLP (Proteinase semelhante a quimiotripsina) converte ainda proMMP-8 (Pro metaloproteinases de matriz 8) e a proMMP-9 para as suas formas ativas que estão associadas à formação de metástases na língua, mucosa esofágica, gástrica, pancreática e colorretal (Figura 6) (Hoare et al., 2019). O Td-CTLP foi correlacionado com o tamanho do tumor, profundidade de invasão e expressão de TLR7 (receptor Toll-like 7), TLR9 (receptor Toll-like 9) e c-Myc em pacientes com carcinoma de células escamosas de língua móvel (MTSCC) (Nieminen, et al., 2018).

Nieminen et al. (2018) empregaram coloração imunoquímica para mostrar que Td-CTLP ativou proMMP-8 e MMP-9, degradou o inibidor de tecido de metaloproteinase (TIMP)-1, TIMP-2 e alfa-1-antiquimotripsina (α -1-AC), também como complemento C1q. Além disso, independentemente do papel na via clássica do complemento, o C1q contribuiu para a adesão, migração e proliferação das células cancerígenas no microambiente tumoral (Bulla, Tripodo, Rami, Ling, Agostinis, Guarnotta, Zorzet et al., 2016). Nieminen e colegas (2018) indicaram que o *T. denticola* pode atuar contra as proteínas imunomoduladoras acima mencionadas para modular o microambiente tumoral e a inflamação, contribuindo assim para a progressão do cancro orodigestivo.

Gaibani et al. (2010) descobriram que o principal complexo de proteínas de superfície de *T. denticola* regulou positivamente a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e MMP-9 em monócitos periféricos humanos (Gaibani, Caroli, Nucci & Sambri, 2010). Por outro lado, flagelos periplasmáticos de *T. denticola* não apenas induziram a produção de mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, mas também da citocina antiinflamatória IL-10 (Interleucina-10) para atenuar a resposta imune (Ruby, Martin, Passineau, Godovikova, Fenno & Wu, 2018).

Em células epiteliais gengivais, *T. denticola* também pode suprimir a expressão do peptídeo antimicrobiano β -Defensina-2 humana (HBD-2) e quimiocina IL-8 para modular a resposta imune inata do hospedeiro. O grupo de Choi (2010) indicou que *T. denticola* não apenas reprimiu a expressão de IL-8 através da degradação de TNF- α e inibição da sinalização dependente de ROS, mas também regulou negativamente a expressão de HBD-2 através da inibição da produção de TNF- α e TLR-2 ativação (Shin, & Choi, 2010; Jo, Baek, Shin & Choi, 2014).

É relevante perceber se estas bactérias atuam de forma sinérgica ou antagônica na ativação das vias inflamatórias associadas ao cancro. Neste contexto foi demonstrado que a infecção das células epiteliais por *P. gingivalis* e *F. nucleatum* desencadeia a via do TLR2 levando à produção de IL-6 e à ativação da STAT3 que estimulam a proliferação celular. A infecção por estas duas bactérias também promove a migração celular, no entanto os mecanismos que poderiam explicar este efeito ainda não se encontram bem definidos (Hoare et al., 2019).

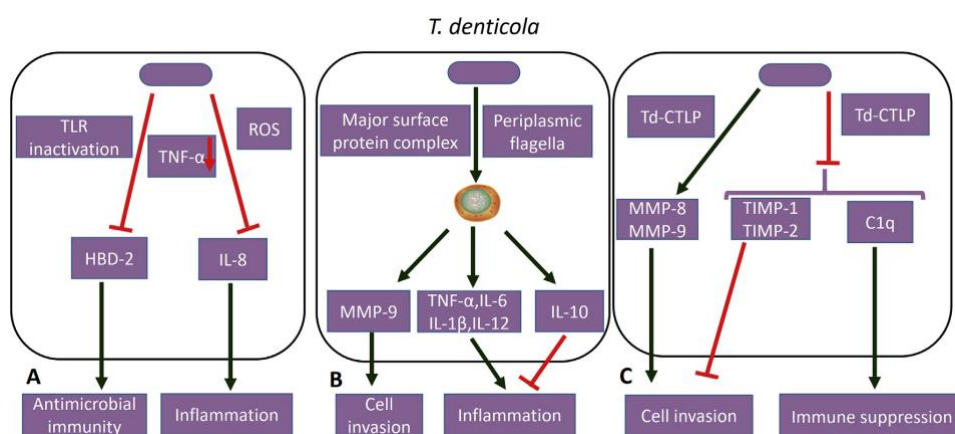


Fig. 6. A relação entre *T. denticola* e a iniciação e desenvolvimento da carcinogênese.
(Adaptado de Zhang, Wang, Wang, Tang, Tang & Liang, 2019)

1.4. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (*A. actinomycetemcomitans*) é uma bactéria gram-negativa que está presente na cavidade oral de uma grande proporção da população humana (Henderson, Ward & Ready, 2010). A prevalência desta bactéria mostra grande variação dependendo da origem geográfica, idade e estilo de vida da população examinada (Kinane & Bouchard, 2008; Haubek, 2010). *A. actinomycetemcomitans* é parte da flora normal em muitos indivíduos saudáveis, mas também é um importante agente etiológico em algumas formas agressivas de periodontite (Fine, Kaplan, Kachlany & Schreiner, 2006).

A. actinomycetemcomitans pode secretar uma variedade de toxinas, das quais as três seguintes são as mais estudadas. A primeira é a leucotoxina (LtxA), uma lipoproteína pertencente à família de toxinas RTX (Repeats in ToXin), ligada a neutrófilos, monócitos e linfócitos. Ele forma poros na sua membrana celular, alterando assim sua função de homeostase osmótica e levando à morte celular (Johansson, 2011).

O segundo tipo são as toxinas citotóxicas distencivas (Cdt), uma toxina bacteriana do trîmero AB₂, e é composto por três subunidades: CdtA (toxinas citotóxicas distencivas A) e CdtC (toxinas citotóxicas distencivas C) que representam a porção reguladora, enquanto que a atividade catalítica depende do CdtB (toxinas citotóxicas distencivas B) (Lara-Tejero & Galán, 2000).

A exposição à Cdt geralmente leva a consequências celulares que dependem da atividade de CdtB, começando na interrupção do ciclo celular até à distensão celular e, eventualmente, à apoptose (Johnson & Lior, 1987; Pérès, Marchès, Daigle, Nougaurède, Herault, Tasca Rycke et al., 1997; Gelfanova, Hansen & Spinola, 1999; Blazkova, Krejcikova, Moudry, Frisan, Hodny & Bartek., 2010). Além disto, a libertação desta toxina pode levar à formação de DSB (Double-strand breaks) (Sugai, Kawamoto, Pérès, Ueno, Komatsuzawa, Fujiwara, Kurihara et al., 1998). O elevado interesse em bactérias que induzem DSB's no hospedeiro é impulsionado em grande parte por conotações com a carcinogénese causada pela instabilidade aumentada do genoma. As interrupções do ciclo celular provocadas por estas toxinas, resultando na formação do microambiente do tecido correspondente, que não só promove a sobrevivência e a proliferação das células transformadas pelo fenótipo secretor associado à senescência (SASP), mas também promove a ocorrência de cancro (Davalos, Coppé, Campisi & Desprez, 2010; Campisi, 2013).

Sugai et al. (1998) mostraram que *A. actinomycetemcomitans* possui genes responsáveis por Cdt's, e o sobrenadante da cultura bacteriana induziu não apenas alterações morfológicas, mas também interrupção da fase G2/M. Trabalhos realizados com células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) mostraram que a Cdt também é responsável pela indução da produção de citocinas pró-inflamatórias por essas células (Akifusa, Poole, Lewthwaite, Henderson & Nair, 2001).

Em alguns casos, a instabilidade genética causada pelo reparo impróprio de danos ao ADN é uma razão significativa para o desenvolvimento de cancro. Nos outros casos, a Cdt também pode induzir apoptose. Quando os sistemas DDR (DNA damage response) falham em reparar adequadamente o dano ao ADN, ativando assim o p53, levando à ativação da via apoptótica intrínseca, que acaba por conduzir a célula apoptótica à morte (Jinadasa, Bloom, Weiss & Duhamel, 2011). Ao mesmo tempo, o CdtB tem atividade de fosfatase, que pode decompor PI-3,4,5-P3 (PIP₃: Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato) em PI-3,4-P2, alterando assim a via de sinalização de PI-3K/PIP₃/AKT/pGSK3β (Antifosforilação de glicogénio sintase quinase-3beta), levando à inativação da via de Akt a jusante, que em última análise leva à interrupção do ciclo celular e ativação da cascata de apoptose (Shenker, Dlakic, Walker, Besack, Jaffe, LaBelle & Boesze-Battaglia, 2007). O PIP₃ é sintetizado principalmente por PI-3Ks (Fosfoinositídeo 3-quinase) intracelulares. Acompanhado por um grande consumo de PIP₃, que leva à ativação excessiva de PI-3K. Como PI-3K (Fosfoinositídeo 3-quinase) é um dos principais efetores do KRAS (Gene Homólogo do Vírus do Sarcoma de Kirsten), a ativação da sinalização do KRAS por RAC1(substrato 1 da toxina botulínica C3 relacionada com Ras) via PI3K é necessária para a mutação do KRAS. É bem conhecido que quase todos os adenocarcinomas ductais pancreáticos apresentam mutações no gene KRAS (Wu et al., 2014). Portanto, a Cdt também pode modular a ciclomodulina além da genotoxina. Com base no mecanismo de ação da Cdt acima, algumas pesquisas já confirmaram que a Cdt pode promover a ocorrência de cancro do fígado e colorretal (Ge et al., 2007; Graillet et al., 2016).

O terceiro tipo de citotoxina é o gene E associado à citotoxina (CagE). O CagE pode ter atividade helicase e o seu papel na regulação da expressão da metilação do ADN é considerado como possível mecanismo de tumorigénese. Por causa das funções acima, CagE pode participar em uma variedade de atividades celulares, incluindo mutagénese, senescência e regulação da expressão génica específica de tecido. Portanto, o gene CagE pode ser amplamente expresso em várias linhas de células cancerígenas e tecidos cancerígenos (Kim & Jeoung, 2008).

Os patógenos periodontais, incluindo *A. actinomycetemcomitans*, podem infectar células hospedeiras e induzir inflamação através da produção de IL-8, pelas células

epiteliais infetadas (Teshima, Hanada, Akada, Kawano & Yamaoka, 2018). Estudos epidemiológicos e *in vivo* sustentam que a Cdt contribui para a patogenicidade microbiana ao aumentar a colonização bacteriana e a inflamação dos tecidos (Ge, Schauer & Fox, 2008). Esses estudos propõem que a Cdt participa da aquisição de um fenótipo tumorigênico, provavelmente por meio da indução de danos no ADN. Na verdade, a exposição crônica de células de mamíferos com doses subletais de Cdt promove a aquisição de características de células cancerígenas, a saber, instabilidade genética, aumento do crescimento independente e respostas ao ADN danificado (Guidi, Guerra, Levi, Stenerlöv, Fox, Josenhans, Masucci et al., 2013).

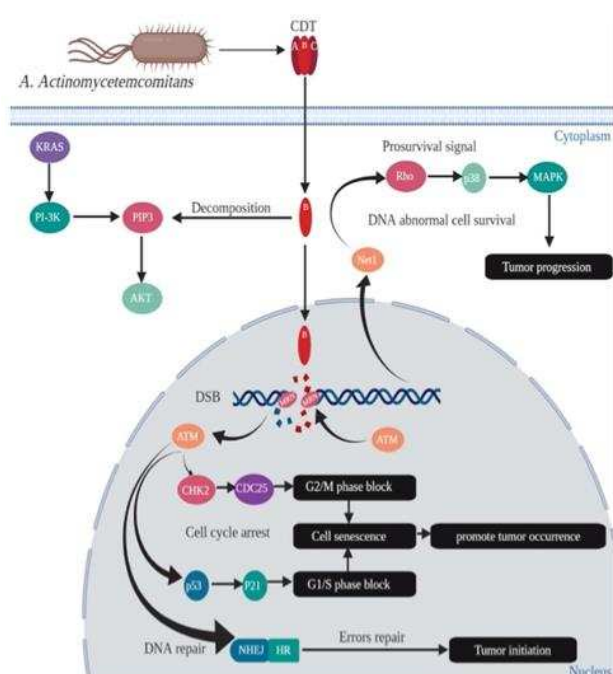


Fig. 7. Mecanismos dos fatores de virulência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* que induzem alterações nas células do hospedeiro. (A) Toxinas distensivas citoletais (CDT) são os fatores de virulência libertados por *A. actinomycetemcomitans*: No citoplasma, a atividade da fosfatase de CdtB pode decompor PIP3, superativando assim PI-3K, que é um dos efetores de KRAS. Este processo pode causar mutação KRAS que leva ao cancro. No núcleo, o CdtB causa a quebra da fita dupla (DSB), que ativa a ataxia telangiectasia mutada (ATM) quinase. A ativação da ATM quinase bloqueia as fases G1/S e G2/M promovendo a ocorrência do tumor através da senescência celular. A iniciação do tumor também pode ocorrer no caso de mecanismos de reparo errôneos na recombinação homóloga (HR) e na união de extremidades não homólogas (NHEJ). Para que as células sobrevivam, RhoA (membro da família Ras homólogo A) e p38 MAPK serão ativados, promovendo assim a tumorigénese. (Adaptado de Sun, Xiong, Teh, Lim, Kumar & Thilakavathy, 2019).

1.5. *Tannerella forsythia*

Tannerella Forsythia (*T. forsythia*) é uma bactéria Gram-negativa anaeróbia, atualmente pertencente ao gênero *Tannerella* (Sharma, 2010), implicada na doença periodontal como uma parte do “complexo vermelho” de patógenos periodontais juntamente com *P. gingivalis* e *T. denticola*.

T. forsythia não tem capacidade de degradar açúcares logo, para crescer e obter energia, esta precisa de peptídeos que são decompostos por proteases semelhantes à tripsina e proteases semelhantes à cisteína PrtH. A protease semelhante à tripsina está envolvida na degradação de peptídeos menores e, por si só, não desempenha um papel central na virulência bacteriana. É uma serina protease, descrita pela primeira vez por Grenier. Em contraste, a protease PrtH tem a capacidade de clivar substratos proteicos maiores.

Outra protease conhecida de *T. Forsythia* é a carilisina. Esta enzima pode contribuir para a disseminação do fator de necrose tumoral ativo - TNF α a partir de macrófagos. Ele inibe a ativação das vias do complemento e causa a degradação do peptídeo antimicrobiano LL-37 (Ksiazek, Mizgalska, Eick, Thøgersen, Enghild & Potempa, 2015). A serina protease dependente de cálcio - mirolase tem um efeito semelhante. Além da degradação do peptídeo antimicrobiano LL-37, também degrada o fibrinogênio e a hemoglobina (Ksiazek, Karim, Bryzek, Enghild, Thøgersen, Koziel & Potempa, 2015). Ele também tem uma alta capacidade de modular a atividade do sistema complemento. Pode inibir a via clássica e a via da lectina de ativação do complemento. Além disso, liberta o peptídeo C5a, que resulta na migração de neutrófilos (Jusko, Potempa, Mizgalska, Bielecka, Ksiazek, Riesbeck, Garred et al., 2015). Devido à irreversibilidade da proteólise e ao mecanismo de ação das proteases nas células do hospedeiro, seu papel na patogênese das doenças periodontais é indicado. Eles podem causar degradação de componentes proteicos de tecidos infectados, proteger bactérias contra a resposta imune e facilitar a colonização de patógenos (Sharma, 2010; Ksiazek et al., 2015).

T. forsythia desempenha um papel importante no estabelecimento e desenvolvimento do cancro esofágico e da doença periodontal (Ksiazek, Mizgalska, Eick, Thøgersen, Enghild, & Potempa, 2015). A resposta imune do hospedeiro a bactérias e uma série de fatores de virulência de *T. forsythia* contribuem para o desenvolvimento de doenças periodontais (Friedrich, Gruber, Nimeth, Pabinger, Sekot, Posch, Altmann et al., 2015). Foi demonstrado que *T. forsythia* pode induzir citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6, pelas células T helper CD4 + e TNF- α .

A superfície desta bactéria é coberta por proteínas bspA com repetições ricas em leucina (domínio LRR: repetição rica em leucina). A BspA liga-se à fibronectina extracelular e ao fibrinogénio, o que permite a adesão e proliferação de *T. forsythia*. As lipoproteínas expostas à superfície bacteriana são cruciais para o crescimento das bactérias no organismo hospedeiro. Estas frações conduzem à apoptose de células de fibroblastos gengivais humanos por ativação da caspase-8 e indução da formação de citocinas como IL-6. A atividade da glicosidase de *T. forsythia* permite que ela cresça e sobreviva (Malinowski, et al., 2019). A sua produção de glicosidases levam à hidrólise dos oligossacarídeos e proteoglicanos do hospedeiro para fornecer os nutrientes a *T. forsythia*. Além disso, na presença de glicose, a bactéria acumula grande quantidade de produto tóxico metil glioxálico, que contribui para o dano aos tecidos do hospedeiro. *T. forsythia* também demonstrou aumentar o número de *P. gingivalis* devido à sua capacidade de reduzir fumarato a succinato (precursor da síntese de lipídios e fosfolipídios). *P. gingivalis*, devido à sua alta atividade proteolítica, fornece peptídeos e aminoácidos a *T. forsythia* que são libertados dos tecidos danificados do hospedeiro (Sharma, 2010). Esses patógenos são de fundamental importância no desenvolvimento da doença periodontal, e podem contribuir para o desenvolvimento de cancro do esófago.

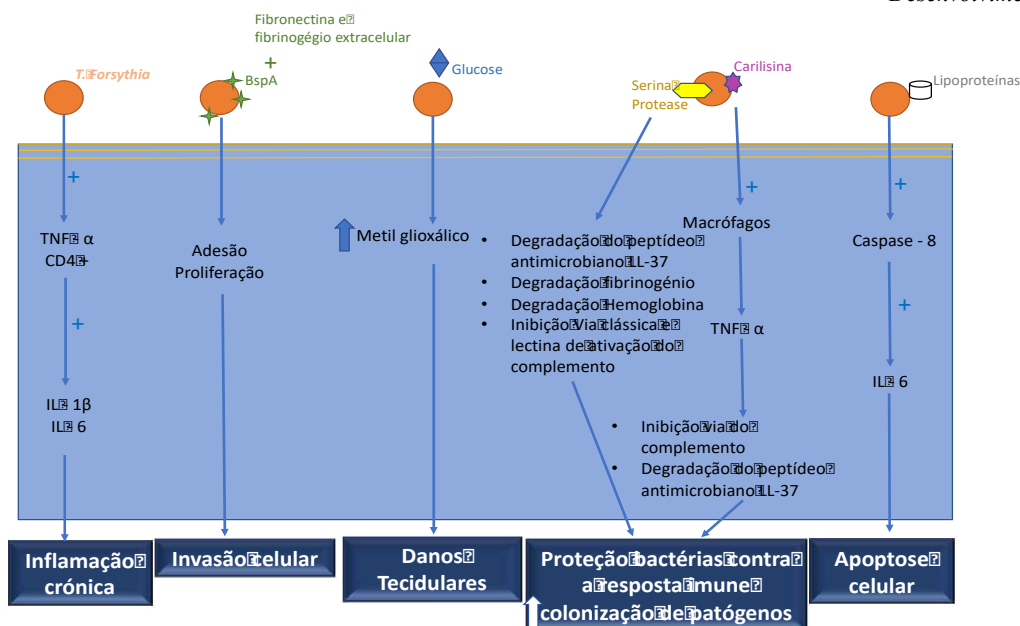


Fig. 8. Possíveis mecanismos causados por *Tannerella Forsythia* e a sua influência na patogênese do câncer.

(Figura do autor.)

1.6. *Streptococcus anginosus*

Streptococcus anginosus (*S. anginosus*), um dos estreptococos viridans orais, faz parte da flora normal encontrada na cavidade oral humana, trato gastrointestinal e genital (Rahman, Nguyen, McCullor, King, Jorgensen & McShan, 2016; Whiley, Beighton, Winstanley, Fraser, & Hardie, 1992).

S. anginosus é uma bactéria redutora de sulfato envolvida no metabolismo do enxofre do cólon e demonstrou induzir citocinas inflamatórias em células epiteliais esofágicas (Morita, narikiyo, Yano, Nishimura, Igaki, Sasaki, Terada et al., 2003). Estes relatos, além da observação noutros estudos, destacam o provável papel desta bactéria oral em várias formas de cancro e justifica mais investigações para delinear seu papel como condutor ou passageiro na carcinogénese.

A presença de microrganismos em vários tipos de oncologias humanas foi recentemente investigada, e fragmentos de ADN de *S. anginosus* foram frequentemente encontrados em amostras de ADN de tecidos de cancro esofágico, gástrico e displasia do esófago (Sasaki, Igaki, Ishizuka, Kogoma, Sugimura & Terada, 1995; Sasaki, Ishizuka, et al., 1998). Estes resultados sugerem que a infecção por *S. anginosus* ocorre num estágio

inicial do cancro do esófago e está relacionada à carcinogénese esofágica e gástrica. *S. anginosus* é classificado como uma bactéria oral e pode ser isolado de várias partes do corpo, como cavidade oral, trato gastrointestinal e trato geniturinário. É frequentemente associada a infecções piogénicas, incluindo a endocardite (Piscitelli, Shwed, Schreckenberger & Danziger, 1992; Whiley et al., 1992). O ADN de *S. anginosus* também foi encontrado em carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço (Tateda, Shiga, Saijo, Sone, Hori, Yokoyama, Matsuura et al., 2000); foi encontrado com muito menos frequência em tecidos não cancerígenos do esófago e estava ausente nos tecidos de cancro do cólon, pulmão, bexiga, renal e cervical (Sasaki, Ishizuka, Muto, Nezu, Nakanishi, Inagaki, Watanabe et al., 1998). Portanto, foi sugerido que o ADN de *S. anginosus* está associado a patologias oncológicas do trato digestivo superior, embora o envolvimento da infecção por *S. anginosus* no processo carcinogénico não tenha sido esclarecido.

A presença de microrganismos em vários tipos de oncologias humanas foi recentemente investigada, e fragmentos de ADN de *S. anginosus* foram frequentemente encontrados em amostras de ADN de tecidos de cancro esofágico, gástrico e displasia do esófago (Sasaki, Igaki, Ishizuka, Kogoma, Sugimura & Terada, 1995; Sasaki, Ishizuka, et al., 1998). Estes resultados sugerem que a infecção por *S. anginosus* ocorre num estágio inicial do cancro do esófago e está relacionada à carcinogénese esofágica e gástrica. *S. anginosus* é classificado como uma bactéria oral e pode ser isolado de várias partes do corpo, como cavidade oral, trato gastrointestinal e trato geniturinário. É frequentemente associada a infecções piogénicas, incluindo a endocardite (Piscitelli, Shwed, Schreckenberger & Danziger, 1992; Whiley et al., 1992). O ADN de *S. anginosus* também foi encontrado em carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço (Tateda, Shiga, Saijo, Sone, Hori, Yokoyama, Matsuura et al., 2000); foi encontrado com muito menos frequência em tecidos não cancerígenos do esófago e estava ausente nos tecidos de cancro do cólon, pulmão, bexiga, renal e cervical (Sasaki, Ishizuka, Muto, Nezu, Nakanishi, Inagaki, Watanabe et al., 1998). Portanto, foi sugerido que o ADN de *S. anginosus* está associado a patologias oncológicas do trato digestivo superior, embora o envolvimento da infecção por *S. anginosus* no processo carcinogénico não tenha sido esclarecido.

Considera-se que *S. anginosus* pode promover carcinogénese ao danificar a mucosa oral e induzir inflamação crónica (Tateda et al., 2000). Narikiyo et al. indicaram que *S. anginosus* estimulou o recrutamento e ativação de neutrófilos e monócitos pela secreção de quimiocinas, o que pode resultar na transição para displasia epitelial e até cancro (Narikiyo, Tanabe,^[1]^[2]Yamada, Igaki, Tachimori, Kato, Muto et al., 2004).

Como os ambientes desses órgãos são geralmente condições ácidas leves (Fallingborg, 1999; Hassen et al., 2015; Khutoryanskiy, 2015; O'Hanlon, Moench & Cone, 2013), a aciduricidade de *S. anginosus* pode ser um traço de patogenicidade, permitindo que o microrganismo promova a infeção numa condição ácida seguida por uma infeção aberrante noutros locais do corpo ou infeções sistémicas (Mak, Milliken & Saremi, 2011; Wenzler, Chandrasekaran, Salvador, Anwar, Pancholi & McGwire, 2015). *S. anginosus* apresenta propriedades acidúricas significativas que podem ser atribuídas às suas atividades H⁺-ATPase e/ou adenosina desaminase (ADA). Foi sugerido que a tolerância ao ácido de *S. mutans*, *S. pyogenes* ou *S. suis* tem contribuições para a virulência durante uma infeção (Ajami, Abolfathi & Mahmoudi, 2015; Cusumano & Caparon, 2015). Portanto, a tolerância ao ácido exibida por *S. anginosus* pode facilitar a infeção da cavidade oral ou órgãos gastrointestinais pelo microrganismo, o que pode levar à inflamação crónica e, conseqüentemente, dar origem a endocardite infecciosa associada a abscessos em vários locais do corpo, endocardite infecciosa e cancros gastrointestinais superiores.

S. Anginosus induz alterações genéticas que promovem a iniciação do processo carcinogénico. Um dos possíveis mecanismos passa pela produção aumentada de NO (óxido nítrico) e Cox-2 (Cyclooxygenase-2) resultando em danos no ADN e subsequente carcinogénese do tecido infetado (Sasaki, Yamaura, Ohara-Nemoto, Tajika, Kodama, Ohya, Harada et al., 2005); Outro dos mecanismos passa pela integração do ADN extrínseco de *S. anginosus* no genoma do hospedeiro, causando dano ao genoma do hospedeiro (Tateda et al., 2000); *S. anginosus* é capaz, ainda, de converter etanol em acetaldeído, que causa mutações pontuais, forma adutos de ADN ou inibem enzimas de reparo de ADN, que podem promover a carcinogénese (Moritani, Takeshita,^[1]^[2] Shibata, Ninomiya, Kiyohara & Yamashita, 2015; Lachenmeier, Gumbel-Mako, Sohnius, Keck-Wilhelm, Kratz & Mildau, 2009).

No entanto, há evidências acumuladas que revelam que *S. anginosus* também

envolve a imunidade anti-tumoral via células T. Frequências elevadas de granzima B (um grânulo serino-protease do linfócito T citotóxico) para *S. anginosus* foram observadas em diferentes estágios de pacientes com Carcinoma oral de células escamosas (Wang, Sun, Lin, Li, Mao & Jiang, 2018). Por outro lado, as células T CD8+ reativas a estreptococos apresentaram regulação negativa de PD-1 (proteína de morte celular programada 1). A regulação positiva de PD-1 está correlacionada com a metástase linfática e um mau prognóstico de pacientes com cancro (Maruse, Kawano, Jinno, et al., 2018). Resta saber se o bloqueio de PD-1 poderia aumentar as respostas citotóxicas de células T CD8+ reativas a estreptococos, o que pode representar uma modalidade de tratamento promissora.

Em conjunto, *S. anginosus* pode desempenhar papéis duplos no desenvolvimento do cancro. Pode não só promover o seu processo etiológico por meio da indução de inflamação e alterações genéticas, mas também impedir isso ao prejudicar as respostas imunológicas anti-tumorais mediadas por células T. Outras investigações são necessárias para elucidar o mecanismo molecular pelo qual *S. anginosus* modula o desenvolvimento, a imunidade anti-tumoral e o prognóstico.

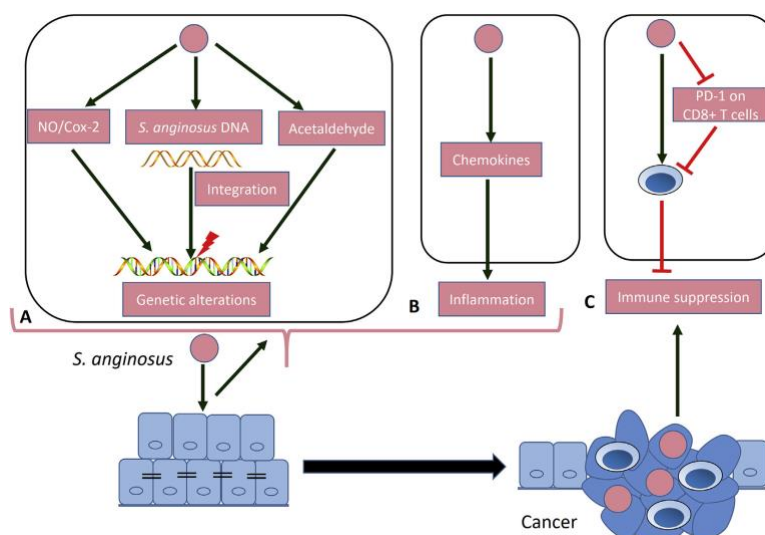


Fig. 9. A Associação de *S. anginosus* com a iniciação e desenvolvimento da carcinogénese.
(Adaptado de Zhang, Wang, Wang, Tang, Tang & Liang, 2019)

1.7. Substâncias Carcinogénicas

Ainda existe pouco conhecimento sobre substâncias cancerígenas produzidas por bactérias orais. Substâncias que podem ter um efeito carcinogénico, incluindo os seguintes: espécies reativas de oxigénio (ROS) e espécies reativas de nitrogénio (RNS), compostos de enxofre voláteis (VSC) e ácidos orgânicos. A metabolização de álcool em acetaldeído por microrganismos também desempenha um papel importante no desenvolvimento de cancro.

Durante uma resposta inflamatória, sob a influência de $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 e $\text{TGF-}\beta$, células epiteliais e do sistema imunológico desencadeiam espécies reativas de oxigénio e espécies reativas de nitrogénio (Landskron, De la Fuente, Thuwajit, Thuwajit & Hermoso, 2014; Mittal, Siddiqui, Tran, Reddy & Malik, 2014). A produção de ROS e RNS ocorre através da indução de NADPH oxidase e óxido nítrico sintase (NOS), respetivamente. A NADPH oxidase catalisa o anião superóxido (O_2^-) levando a superóxido dismutase (SOD^-), produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) mediada. Simultaneamente, NOS gera óxido nítrico (NO), que pode ser convertido em dióxido de nitrogénio (NO_2), peroxinitrito (ONOO^-) e trióxido de dinitrogénio (N_2O_3) (Förstermann & Sessa, 2012).

Algumas espécies da cavidade oral estão envolvidas neste processo de produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Bactérias peroxigénicas orais conhecidas incluem: *Streptococcus oralis*, *S. mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oligofermentans* (Abranches, Zeng, Kajfasz, Palmer, Chakraborty, Wen, Richards et al., 2018), *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus jensenii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus minutus* e *Bifidobacterium adolescentis* (Brauncajs, Sakowska & Krzeminski, 2001). Aumento da expressão de NADPH oxidase, óxido nítrico sintase e suas espécies reativas de oxigénio e nitrogénio foram identificadas em vários tipos de cancro. Estes achados apoiam a conexão de radicais livres com inflamação crónica e seu papel no cancro desenvolvimento e progressão maligna (Hussain, Hofseth, & Harris, 2003; Piao, Lee, Kim, Kim, Han, Ngo, Park et al, 2016).

Algumas bactérias orais (por exemplo, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Fusobacterium nucleatum*)

produzem compostos de enxofre voláteis (VSCs) como sulfeto de hidrogénio (H_2S), metil mercaptano (CH_3SH), sulfeto de dimetil ($(\text{CH}_3)_2\text{S}$) e dimetil dissulfeto (CH_3SSCH_3). H_2S ocorre na maior concentração no ar dentro da boca, enquanto em nas bolsas gengivais o composto dominante é o CH_3SH (Koczorowski & Karpinski, 2001; Koczorowski, Karpinski & Hofman, 2004). Mesmo em baixas concentrações, VSCs são tóxicos para os tecidos e desempenha um papel na patogénese da periodontite e no desenvolvimento de doenças crónicas inflamatórias (Milella, L., 2015). H_2S é um agente genotóxico conhecido e pode levar à instabilidade genómica ou cumulativas mutações (Attene-Ramos, Wagner, Plewa & Gaskins, 2006). O aumento da expressão de várias enzimas produtoras de H_2S foi observado em células cancerígenas particularmente nos cânceros de cólon e ovários. Superexpressão da inflamação da cistationina- β -sintase causa a produção de quantidades aumentadas de H_2S , que afetam o crescimento do tumor e a propagação por ativação de proliferação, migração e vias de sinalização invasivas e aumentar a angiogénese tumoral (Hellmich & Szabo, 2015). Recentemente, descobriu-se que o H_2S tem efeitos dicotómicos (estimuladores e inibidores) em vários processos gastrointestinais, como inflamação, cancro e apoptose (Singh & Lin, 2015).

Algumas bactérias orais pertencentes aos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus* produzem ácido láctico (Karpinski & Szkaradkiewicz, 2015). Hooper et al. relataram que a maioria dos táxons isolados de dentro do tecido tumoral do carcinoma de células escamosas da boca representam espécies sacarolíticas e acidúricas, principalmente estreptococos (Hooper, et al., 2007). Esses microrganismos são acidogénicos e acidúricos e, por produzirem ácido láctico, têm influência na redução do pH no ambiente local (Senneby, Davies, Svensäter & Neilands, 2017). Algumas espécies são capazes de produzir mais ácidos (por exemplo, *Peptostreptococcus stomatis* acidúrico produz ácidos acético, butírico, isobutírico, isovalérico e isocapróico) (Downes & Wade, 2006). A produção de tais ácidos pode contribuir para o microambiente ácido e hipóxico dos tumores, aumentando assim a eficiência metastática (Lunt, Chaudary & Hill 2009; Mazzio, Smith & Soliman, 2010).

Os microrganismos orais são capazes de metabolizar o álcool em acetaldeído, que é indiscutivelmente carcinogénico. Várias espécies microbianas orais, como

Streptococcus gordonii, *S. mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus sanguinis* (Pavlova, Jin, Gasparovich & Tao, 2013) e leveduras *Candida* possuem a enzima álcool desidrogenase (ADH), que metaboliza o álcool em acetaldeído (Marttila, Bowyer, Sanglard, Uittamo, Kaihovaara, Salaspuro, Richardson et al., 2013). Microrganismos contendo ADH apresentam um risco para a produção de acetaldeído carcinogénico, com potencial subsequente para o desenvolvimento de cancro oral (Salaspuro, 1997; Meurman & Uittamo, 2008). Muto et al. (2000) mostraram que o género *Neisseria* tinha atividade ADH extremamente alta e produzia quantidades significativas de acetaldeído in vitro. A capacidade de *Neisseria* de produzir acetaldeído foi mais de 100 vezes maior do que a produzida por *Streptococcus sp.*, *Stomatococcus sp.* Ou *Moraxella sp.* Os autores sugeriram que *Neisseria* pode ser uma fonte regional de acetaldeído carcinogénico e, portanto, pode desempenhar um papel essencial na carcinogénese relacionada ao álcool em humanos (Muto, Hitomi, Ohtsu, Hitomi, Ohtsu, Shimada, Kashiwase et al., 2000).

2. Cancro esofágico

O cancro do esófago é o oitavo mais comum e a sexta principal causa de morte por cancro em todo o mundo (Olsen & Yilmaz, 2019). A dificuldade de diagnóstico precoce, natureza agressiva e baixa taxa de sobrevivência são características do cancro esofágico. Os dois subtipos principais desta patologia, o carcinoma de células escamosas (CCE) e o adenocarcinoma esofágico (ACE), diferem muito na etiologia, geografia e incidência. Fatores como tabagismo, consumo de álcool, higiene oral precária, resposta ao consumo de álcool e deficiência nutricional foram reconhecidos como as principais causas de CCE esofágico (Lagergren, Smyth, Cunningham & Lagergren, 2017). Já o refluxo gastroesofágico, obesidade e o tabagismo são os principais fatores de risco de ACE esofágico (Rubenstein & Shaheen, 2015). O prognóstico para pacientes com cancro do esófago depende muito do momento do diagnóstico. A maioria dos pacientes é diagnosticado em estágio avançado devido ao desenvolvimento assintomático, apresenta metástases linfonodais e tem um prognóstico desfavorável.

Evidências crescentes têm vindo a surgir de que a doença gastroesofágica é influenciada pela microbiota esofágica e que as bactérias comensais da orofaringe, estômago e cólon têm um papel na modulação da patogénese. Essas hipóteses emergentes são baseadas em mudanças observadas na composição da flora esofágica, notadamente, observações repetidas. São estas, a existência de uma abundância de bactérias gram-positivas no esôfago saudável. E que a população de bactérias esofágicas tornam-se cada vez mais gram-negativa com a progressão da doença. Associado a esta mudança para uma prevalência mais gram negativa está um aumento no potencial para a presença de lipopolissacarídeo antigénico. A imunorreatividade da endotoxina LPS acredita-se que promova a suscetibilidade à inflamação e à doença (Steve, Lindsey, Byung, Parth & David, 2020).

A patogénese das doenças mais comuns do esôfago, é a doença do refluxo gastroesofágico (DRGE), dismotilidade esofágica (acalasia), esofagite eosinofílica (EoE), esôfago de Barrett (BE) e cancro esofágico estão bem estabelecidos. Dados emergentes sugerem, entretanto, que todos eles são caracterizados por uma cascata inflamatória imunomediada, propagada por um estado disbiótico. Desse modo, a capacidade do “estado normativo” saudável de proteger contra bactérias estranhas fica comprometida. Esta disbiose, portanto, pode criar respostas inflamatórias ou imunorregulatórias adversas com a progressão da doença.

Houveram várias tentativas de classificar a flora esofágica saudável em diferentes tipos de clusters. Um estudo avaliou pacientes saudáveis com DRGE e demonstrou dois tipos de microbioma, referidos como tipo I e tipo II. Microbioma do tipo I associado a indivíduos saudáveis, consistia principalmente de micróbios gram-positivos, dominados por aqueles dentro do género *Streptococcus*. Por outro lado, o microbioma do tipo II teve uma maior presença de anaeróbios/microaerófilos gram-negativos e se correlacionou principalmente com esofagite e esôfago de Barrett II (Yang, Lu, Nossa, Francois, Peek & Pei, 2009).

No estado normal e saudável, o microbioma esofágico é constituído, em parte, por uma infinidade de bactérias gram-positivas, muitas das quais produzem peptídeos antibacterianos chamados bacteriocinas. As bacteriocinas são seletivas e usadas para

manter a integridade da população matando bactérias estranhas. Quando o "bioma normativo" é interrompido (por exemplo, antibióticos, medicamentos, dieta, fatores ambientais), as mudanças constitucionais podem permitir um desequilíbrio favorecendo a proliferação de patógenos oportunistas. Portanto, parece racional que definir, uma comunidade bacteriana protetora que pudesse ajudar a prevenir ou mitigar doenças inflamatórias do esôfago. Além disso, em conjunto com a evidência que demonstra que algumas bacteriocinas são citotóxicas ou antiproliferativas em relação às linhas de células cancerígenas, uma exploração adicional pode fornecer uma fonte rica de alvos eficazes de fármacos baseados em peptídeos (Steve, Lindsey, Byung, Parth & David, 2020).

Nos últimos anos, muitos estudos epidemiológicos relataram uma conexão potencial entre a doença periodontal e aumento do risco de cancro gastrointestinal (Ahn, Segers & Hayes, 2012; Sun, Zhou, Salazar, Hays, Bedi, Chen & Li, 2017). Além disso, o ADN de certas bactérias orais, incluindo *P. gingivalis* e *S. anginosus*, foi frequentemente detetado em amostras de tecidos de cancerígeno no esôfago. Vários estudos sugeriram que diversas bactérias patogénicas são enriquecidas na saliva de pacientes com cancro do esôfago (Terzi, Demiray, Koroglu, Cakmak, Ciftci, Ozbek & Altindis, 2016; Peters et al., 2017).

Um dos fatores comuns que predis põem ao desenvolvimento de cancro do esôfago é o rompimento do microbioma do trato gastrointestinal. A presença das bactérias *Tannerella forsythia* e *Porphyromonas gingivalis* é de fundamental importância. Esses patógenos são os principais responsáveis pela doença periodontal, porém, também estão associados ao desenvolvimento desta patologia oncológica (Lin, Karakasheva, Hicks, Bass & Rustgi, 2016). Peters et al., (2017) realizaram um estudo prospetivo agrupado em dois coortes, que consistiu na marcação da sequência de 16S ARNr (ARN ribossómico) de bactérias orais a partir de amostras proveniente de bochechos e concluíram que as bactérias orais podem refletir um potencial risco para o desenvolvimento de cancro esofágico. A abundância de *P. gingivalis* está associada a maior risco de carcinoma esofágico e a *T. forsythia* a um maior risco de adenocarcinoma do esôfago. A *P. gingivalis* foi também associada a metástases nos gânglios linfáticos, concomitante com a redução do tempo de vida (Olsen & Yilmaz, 2019).

Esses microrganismos causam interferência na barreira epidérmica do hospedeiro e induzem inflamação, incluindo a ativação de NF- κ B (Lin et al., 2016). O mecanismo patológico do cancro do esófago com o envolvimento de *T. forsythia* e *P. gingivalis* foi discutido em detalhes em capítulos anteriores.

Gao et al., (2016) através de análise imunohistoquímica de carcinomas do esófago detetaram uma taxa de 61% de *P. gingivalis*, 12% nos tecidos adjacentes e nulo na mucosa normal. Observaram a presença de *gingipain* (lisina) específica e 16S ADNr (ADN recombinante) da *P. gingivalis* e níveis séricos de Imunoglobulinas A e G significativamente mais elevadas no carcinoma esofágico em comparação com esofagite e um grupo controlo saudável. Os resultados deste estudo implicam a *P. gingivalis* na patogénese do cancro esofágico e a presença combinada de biomarcadores como as imunoglobulinas é melhor do que um único marcador no diagnóstico (Olsen & Yilmaz, 2019). Segundo She-Gan Gao e colaboradores (2018), os níveis séricos médios de IgA (Imunoglobulina A) e IgG (Imunoglobulina G) contra *P. gingivalis* foram significativamente mais altos no CCE do que em casos de esofagite e casos controlo saudáveis. A IgA para diagnosticar a CCE precoce provou ser muito melhor que a IgG (54,54% versus 20,45%) (Gao, Yang, Ma, Yuan, Zhao, Wang, Wei et al., 2018). Além disso, altos níveis séricos de IgA ou IgG contra *P. gingivalis* foram correlacionados com pior prognóstico em pacientes com CCE, particularmente naqueles com estágio 0 – II ou metástase linfonodal negativa. Pacientes com alta IgA e IgG tiveram o pior prognóstico. Os resultados deste estudo implicaram que *P. gingivalis* pode estar envolvido na patogénese da CCE. Portanto, os biomarcadores séricos de *P. gingivalis* podem ser importantes para a deteção de CCE num estágio inicial e podem melhorar o desempenho diagnóstico e prognóstico.

Em 2001 um estudo realizado pela ABNET na China, com uma amostra de 28.868 participantes observaram que uma má higiene oral representa um risco elevado de desenvolver cancro do esófago e gástrico (Malinowski et al., 2019).

O diagnóstico precoce continua a ser um dos principais determinantes para melhorar a sobrevida a longo prazo de pacientes com cancro esofágico. A maioria dos pacientes apresenta-se em estágio avançado e possui opções limitadas de tratamento,

resultando num prognóstico desfavorável. Embora a gastroscopia com biópsia ofereça um método eficiente para o diagnóstico de pacientes com CCE, a baixa adesão à gastroscopia em pacientes assintomáticos impede a detecção precoce (Hsu, Cheng, Chang, Lee, Koong & Chuang, 2015). Os biomarcadores séricos da *P. gingivalis* podem ser importantes na detecção do cancro do esófago num estágio inicial e melhorar o diagnóstico e prognóstico (Olsen & Yilmaz, 2019).

2.1. Adenocarcinoma Esofágico

O desenvolvimento de adenocarcinoma esofágico (ACE) está associado à inflamação ou lesão perlongada da mucosa, como a observada na doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Como resultado da exposição do epitélio distal do esófago ao refluxo dos ácidos gástricos e biliares, ocorre metaplasia intestinal e, consequentemente, esófago de Barrett (EB). Esta é a mudança precursora do ACE (Grady & Yu, 2018; Lin, et al., 2016). Além disso, o refluxo gastroesofágico, além dos danos diretos ao esófago, é responsável pela produção de espécies reativas de oxigénio. Os radicais livres causam danos ao ADN e as mutações resultantes iniciam o processo da carcinogénese (Lin et al., 2016). A fisiopatologia que contribui para este estado de doença é complexa, envolvendo uma interação entre fatores ambientais, suscetibilidades genéticas e dinâmica do hospedeiro. Aproximadamente 80% dos casos podem ser atribuídos a DRGE, tabagismo, obesidade e baixo consumo de frutas e vegetais (Engel, Chow, Vaughan, Gammon, Risch, Stanford, Schoenberg et al., 2003). Outros fatores de risco incluem distúrbios motores do esófago, outras doenças malignas, medicamentos e exposições ambientais (Susan & Urba, 2000). No entanto, o ACE, como as complicações da DRGE discutidas acima, pode surgir sem sintomas anteriores. Conforme discutido anteriormente, a patogénese da DRGE segue uma cascata mediada por inflamação, em vez de por lesão química direta da superfície da mucosa. Por outro lado, GERD não é um fator de risco para CCEE (Carcinoma de Células Escamosas do Esófago).

O microbioma do ACE foi caracterizado como semelhante ao microbioma do tipo II, as espécies periodontopáticas individuais derivadas do microbioma oral estão associadas à doença: *Treponema denticola*, *Streptococcus mitis* e *Streptococcus anginosus* (Narikiyo et al., 2004). Os dois últimos são gram positivos e isso sugere uma

via diferente envolvendo a migração ou o metabolismo de ácidos gordos de cadeia curta, conforme descrito na patogénese do Esófago de Barret, em vez da via de LPS/disbiose discutida anteriormente. Isso sugere que a periodontite e a higiene oral inadequada podem estar associadas ao risco aumentado de cancro do esófago (Michaud, Fu, Shi & Chung, 2017). Em particular, fragmentos de *S. anginosus* foram isolados no carcinoma da cabeça e pescoço, bem como em alterações displásicas precoces de cancro esofágico e gástrico (Tateda et al., 2000). Isso implica que *S. anginosus* está associado a numerosas doenças malignas do trato digestivo superior. O mecanismo exato subjacente a este processo não foi delineado. No entanto, a indução de citocinas inflamatórias por infeção com *S. mitis* (*Streptococcus mitis*) e *S. anginosus* foi demonstrado (Narikiyo et al., 2004). Outras espécies periodontais foram associadas ao cancro do esófago (Peters, et al., 2017). Por exemplo, descobriu-se que os patógenos periodontais *Tannerella Forsythia*, *Veillonella*, *Selenomonas* e *Treponema spp.* estão associados a maior risco de ACE (Malinowski, et al., 2019; Lv, Guo, Liu, Zhao, Zhang & Wang, 2019).

A diminuição da prevalência de *Streptococos* está associada a um risco menor de ACE, o que implica que a flora específica está inversamente relacionada à transformação maligna (Peters et al., 2017). Outras evidências dessa correlação inversa são fornecidas pelo menor risco de ACE associado à infecção por *H.pylori* (Peters et al., 2017). Outros fatores de proteção, como a biossíntese bacteriana de carotenóides por *Neisseria spp.* também foram associados à proteção contra o ACE (Peters et al., 2017). Isso sugere que a colonização comensal por flora específica pode ser protetora do processo metaplásico ao inibir a proliferação de flora pró-inflamatória, bem como por meio da síntese de vitaminas ou talvez eliciando uma resposta imune geralmente protetora.

O risco aumentado de ACE também foi associado à depleção de certas bactérias. Por exemplo, o esgotamento do género comensal *Neisseria* e da espécie *Streptococcus pneumoniae* está associado a um maior risco de ACE (Peters et al., 2017). Isso é corroborado por outros estudos em que a diversidade microbiana também mostrou estar diminuída (Lv et al., 2019; Elliott, Walker, O'Donovan, Parkhill & Fitzgerald, 2017). Foi postulado que, uma vez iniciada a carcinogénese, os *Streptococos* deixam o ambiente

local para invadir o tecido circundante (Zaidi, Kelly, Kreft, Barlek, Omstead, Matsui, Boyd et al., 2016). É concebível que a etiologia de DRGE, do EB e do ACE seja uma progressão de microbiotas. Cada estágio abre a porta para um novo comportamento da microbiota, por exemplo, a migração para os tecidos e células. Assim, uma avaliação e comparação “instantânea” em qualquer momento pode não ser totalmente abrangente e verdadeiramente reflexa de todas as mudanças progressivas.

Recetores semelhantes a Toll são uma classe de proteínas que desempenham um papel regulador importante no sistema imunológico inato. Um mecanismo potencial pelo qual o microbioma participa da carcinogénese é via TLRs (Lv et al., 2019). TLRs 1-3, 6, 7 e 9 são significativamente regulados positivamente no ACE (Zaidi et al., 2016). TLR4 e TLR5 (recetor Toll-like 5) também foram sugeridos como mediadores potenciais da progressão de distúrbios de refluxo para ACE. Isso sugere uma associação entre a via de sinalização TLR e o microbioma alterado. Em biópsias de tecido do esófago, a expressão de TLR-4 (cujo ligante natural é o LPS) está significativamente aumentada no ACE e BE quando comparado ao esófago normal (Neto, Whitaker & Pei, 2016). Além disso, a ativação da via TLR-4-NF- κ B é evidente em distúrbios de refluxo e pode contribuir para a transformação maligna (Yang, Francois & Pei, 2012). Portanto, com microbiomas anormais do tipo II, há um aumento relativo da abundância de bactérias gram-negativas, sobre a estimulação resultante de TLR-4. Isso pode iniciar uma cascata inflamatória maior e mais carcinogénica. Além disso, a expressão da isoforma Cox-2, um gene a jusante da via LPS-TLR-4- NF- κ B, é elevada em carcinomas esofágicos. Foi descoberto que há um aumento de Cox-2 que ocorre ao longo da progressão de displasia de baixo grau para displasia de alto grau na via do ACE (Morris, Armstrong, Bigley, Green & Attwood, 2001). Isso implica que a ativação da via LPS-TLR-4-NF- κ B pode contribuir para a transformação maligna. A teoria foi testada experimentalmente num modelo murino em que a presença de *E. coli* induziu a ativação de TLRs implicados em ACE (Zaidi et al., 2016).

2.2. Carcinoma de Células Escamosas do Esófago

O desenvolvimento do carcinoma de células escamosas do esófago possui vários estágios. O acúmulo de alterações genéticas inicia o processo de carcinogênese, que causa alterações histológicas nas células epiteliais (Klimczak, Bitner & Szemraj, 2011; Szumiło, 2013). Além disso, a presença de inflamação crônica da mucosa do esófago leva à formação de neoplasia intraepitelial, que é considerada uma lesão pré-cancerígena (Itabashi, Nasierowska-Guttmejer, Shimoda, Majewski, Rezner, Sikora, Srutek et al., 2017). No exame endoscópico, isso é dificilmente visível. Essas mudanças podem ser vistas claramente usando o líquido de Lugol, que irá manchar o epitélio plano multilamelar normal (Szumiło, 2013). Ao exame microscópico, a neoplasia intraepitelial é caracterizada por um distúrbio do sistema celular epitelial plano multilamelar e alterações citológicas, como aumento e hipercromicidade do núcleo e aumento da atividade mitótica das células. O próximo estágio de desenvolvimento é o carcinoma de células escamosas inicial. Nesse estágio, a lâmina cancerosa da mucosa esofágica e a submucosa do esófago invadem através da disseminação de células tumorais. No carcinoma espinocelular avançado do esófago, as metástases para os linfonodos são características e as células tumorais podem infiltrar a membrana muscular do esófago (Moreno & Contreras, 2013).

O Carcinoma de Células Escamosas do Esófago (CCEE) é uma doença complexa, com diversos fatores predisponentes, envolvendo componentes genéticos e ambientais. A incidência da doença é influenciada pela exposição ambiental, mas existem variações regionais quanto à natureza da exposição. As áreas de maior incidência incluem Leste Asiático, Sudeste da África e Sudeste da América do Sul (Abnet, Arnold & Wei, 2018). O fumo e o uso do tabaco são os fatores de risco mais comuns em populações mais desenvolvidas, enquanto o consumo de líquidos quentes, carcinogêneos dietéticos e má dentição contribuem o suficiente para a incidência de que a própria pobreza é um fator de risco para patogênese (Abnet, Arnold & Wei, 2018; Yang, Chen & Tu, 2016; Maghsudlu & Yazd, 2017). Há um crescente corpo de literatura que avalia a suscetibilidade genética que pode aumentar a carcinogênese após um estímulo ambiental (Abnet, Arnold & Wei, 2018).

O consumo excessivo de álcool é um forte fator de risco para o CCEE. O acetaldeído, um metabolito direto da oxidação do etanol, inibe o reparo do ADN por meio de uma variedade de mecanismos. O etanol também pode induzir diretamente a produção de espécies reativas de oxidação e promover a modificação epigenética aberrante, em particular a metilação do ADN (Varela-Rey, Woodhoo, Martinez-Chantar, Mato & Lu, 2012). A metilação anormal de genes associados à carcinogénese inibe a expressão de genes supressores de tumor, promove a transcrição de oncogene e é o principal mecanismo proposto para o efeito carcinogénico direto do etanol (Seitz & Stickel, 2007).

A patogénese do CCEE está associada à superexpressão de mediadores inflamatórios. A produção persistente de NF- κ B e a ativação de TLR-4 demonstraram estar presentes no CCEE em estágio inicial, enquanto a produção/ativação diminui com a progressão para estágios avançados (Li, Li, Dong, Wang, Zhu, et al., 2018). TLR-4, em particular, ativa uma resposta inflamatória inata com subsequente ativação de uma cascata inflamatória aguda a crónica (Chen, Winckler, Lu, Cheng, Yuan, Yang, Jin et al., 2015). Isso sugere que a presença de fatores externos afeta a interação local mucosa-micróbio. Isso leva a uma reação inflamatória localizada. A persistência dessa inflamação, associada a uma predisposição genética, desencadeia a hiperproliferação do tecido escamoso e a progressão para carcinoma.

Tal como acontece com o adenocarcinoma esofágico, foi demonstrado que o CCEE está associado a patógenos periodontais e higiene oral deficiente (Abnet Arnold & Wei, 2018; Chen et al., 2015). Especificamente, a abundância do patógeno periodontal *Porphyromonas gingivalis* tendeu a apresentar maior risco de CCEE (Gallimidi, Fischman, Revach, Bulvik, Maliutina, Rubinstein, Nussbaum, et al, 2015). Num estudo, a má saúde oral foi relatada como um fator de risco para displasia escamosa esofágica (Sepehr, Kamangar, Fahimi, Saidi, Abnet & Dawsey, 2005). Até este ponto, o Carcinoma oral de células escamosas, também associado à má higiene oral, tem sido relacionado a alterações na microbiota oral (*Firmicutes*, *Streptococos*, *Actinobactérias* e *Rothia*), que foram substancialmente diminuídas em relação ao tecido normal (Schmidt, Kuczynski, Bhattacharya, Huey, Corby, Queiroz, Nightingale et al., 2014). Foi demonstrado que o CEC oral está acompanhado de outros carcinomas de células escamosas do trato digestivo

(Jovanovic, van der Tol, Kostense, Schulten, Vries, Snow & Waal, 1994). Foi sugerido que uma região das células epiteliais pode ser afetada por alterações carcinogênicas (Simple, Suresh, Das & Kuriakose, 2015).

Indivíduos com CCEE também demonstraram apresentar diversidade microbiana diminuída (Chen, Winckler, Lu, Cheng, Yuan, et al., 2015). Curiosamente, esta diminuição na diversidade microbiana foi replicada em outros locais anatómicos do sistema GI, como o estômago com gastrite (Yu, Gail, Shi, et al., 2014), e o cólon com cancro colorretal (Ahn, Sinha, Pei, Dominianni, Wu, et al., 2013). Mudanças na microbiota gástrica também foram associadas ao CCEE, e as ordens *Clostridiales* e *Erysipelotrichales* foram particularmente implicadas (Nasrollahzadeh, Malekzadeh, Ploner, Shakeri, Sotoudeh, et al., 2015).

Além dos efeitos carcinogênicos diretos, fatores ambientais como álcool e tabaco podem alterar o microbioma local e contribuir para a carcinogênese. O consumo de álcool em pacientes com microflora oral abundante com flora oxidante leva à produção de acetaldeído e subsequente inibição do reparo do ADN, levando ao aumento da suscetibilidade ao carcinoma de células escamosas oral (Homann, Kärkkäinen, Koivisto, Nosova, Jokelainen & Salaspuro, 1997). O uso de tabaco está associado ao aumento da abundância de *Streptococcus spp.* e levedura capaz de metabolizar álcool para acetaldeído, bem como inibindo a degradação do acetaldeído, sugerindo que a persistência do aldeído salivar pode contribuir para a carcinogênese esofágica (Matejic, Gunter & Ferrari, 2017). O uso de álcool está associado a um aumento da proporção Firmicutes: bacteroidetes em amostras fecais murinas (Bull-Otterson, Feng, Kirpich, Wang, Qin, Liu & Gobejushvili, 2013). Essa proporção aumentada altera o metabolismo local de nutrientes e aumenta os níveis séricos de LPS, e pode sugerir outros meios de potencializar a patogênese.

3. A influência da resposta imune do hospedeiro

O microbioma oral dinâmico e polimicrobiano é um precursor direto de doenças como cárie dentária e periodontite, duas das doenças induzidas por micróbios mais prevalentes em todo o mundo. Microambientes distintos em barreiras orais abrigam comunidades microbianas únicas, que são reguladas por sistemas sofisticados de sinalização e por fatores ambientais e do hospedeiro. A função coletiva das comunidades microbianas é o principal impulsionador da homeostase ou disbiose e, em última análise, da saúde ou doença (Lamont, Koo & Hajishengallis, 2018)

A microbiota contribui para a nutrição e equilíbrio energético do hospedeiro e para o desenvolvimento ou manutenção de um sistema imunológico robusto. Por sua vez, o hospedeiro fornece um nicho no qual os micróbios individuais podem persistir em comunidade, a partir do qual podem obter nutrientes essenciais, garantindo sua transmissão e retenção dentro da espécie hospedeira. Embora tenha sido proposto que a microbiota tem papéis importantes numa série de doenças sistêmicas, apenas o advento de novas ferramentas experimentais, incluindo animais gnotobióticos colonizados com micróbios comensais definidos, modelos de inflamação em camundongos e abordagens independentes de cultura, particularmente sequenciamento paralelo maciço tecnologia, resultou em novos insights sobre como a microbiota interage com o sistema imunológico do hospedeiro. Estudos recentes forneceram evidências firmes de que a distorção da comunidade comensal, muitas vezes referida como “disbiose”, pode resultar em doenças inflamatórias não apenas do intestino, mas também de órgãos em locais distais. Tais doenças podem ser desencadeadas não apenas por micróbios patogênicos, mas também por micróbios comensais inofensivos ou aqueles que são normalmente controlados pelo ecossistema microbiano e/ou pelo estado metabólico e resposta imune do hospedeiro. Assim, a perturbação desta homeostase por influências intrínsecas ou extrínsecas, por exemplo, o tratamento com antibióticos de largo espectro, pode resultar em disbiose com risco de vida (Littman & Pamer, 2011).

Em pacientes saudáveis, a homeostase dos constituintes da microbiota evita a agressão por parte dos agentes patogênicos. Diversas famílias de peptídeos

antimicrobianos são descritas e são especificamente projetadas para matar ou inativar microorganismos que entram em contato com as superfícies epiteliais (Zasloff, 2002).

O estado de saúde da cavidade oral é um estado de equilíbrio entre vários organismos e o hospedeiro. A microbiota oral é agora entendida como um órgão cujos mecanismos são muito semelhantes aos do ecossistema da microbiota intestinal. A estabilidade da microbiota aumenta com probióticos e prebióticos (Zaura et al. 2014).

Além disso, os recetores imunes inatos identificam padrões moleculares associados a micróbios conservados em bactérias (Medzhitov & Janeway, 2000). Esse mecanismo é usado pelo sistema imune inato para diferenciar bactérias patogénicas e não patogénicas. Essa distinção entre bactérias patogénicas e inócuas continua a ser a principal preocupação de muitas equipas de investigação.

A infeção pode ser influenciada pelas variações genéticas do hospedeiro, que podem resultar em peptídeos defeituosos (Kalus et al. 2009). Uma comunicação cruzada constante ocorre entre as células epiteliais, que estão presentes na saliva, e os microorganismos comensais para manter a homeostase.

Múltiplos estudos demonstraram que a microbiota oral se sobrepõe à microbiota do trato gastrointestinal e que existem muitos caminhos para a disseminação de bactérias dentro do corpo (Aviles-Jimenez, Vazquez-Jimenez, Medrano-Guzman, Mantilla & Torres, 2014). Lamster et al. (1994) relataram as potenciais relações entre patologias periodontais, a microbiota oral e a resposta do hospedeiro.

4. O papel das bactérias na deteção, prevenção e tratamento do cancro

O diagnóstico precoce continua a ser um dos principais determinantes para melhorar a sobrevida a longo prazo de pacientes com cancro esofágico. A maioria dos pacientes apresenta-se em estágio avançado e possui opções limitadas de tratamento, resultando num prognóstico desfavorável.

As populações microbianas na mucosa oral parecem diferir entre os locais saudáveis e malignos. Por exemplo, *Streptococcus anginosus* e *Treponema denticola* estão associados a vários carcinomas do trato gastrointestinal superior (Narikiyo et al., 2004). Shiga et al. (2001) sugeriram que a infecção por *S. anginosus* pode estar implicada na carcinogénese do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço em geral. O ADN de *S. anginosus* foi detectado em amostras de tecido de carcinoma, mas não em amostras de linfoma, rabdomiossarcoma ou leucoplasia.

Noutro estudo, o ADN mitocondrial salivar foi encontrado aumentado em pacientes com cancro da cabeça e pescoço diretamente em proporção ao grau de malignidade do tecido, isto é, de displasia leve a grave (Kim, Clinger, Masayesva, Ha, Zahurak, Westra, et al., 2004). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar estas descobertas. É importante, ter em mente que o local de amostragem e como pode influenciar os resultados. Em pacientes com cancro oral, a amostragem ideal pode ser difícil (Rautemaa, Rusanen, Richardson & Meurman, 2006). Consequentemente, a técnica de amostragem adequada tanto para o cultivo convencional quanto para os novos métodos moleculares precisa ser enfatizada (Rusanen, Siikala, Uittamo, Richardson & Rautemaa, 2009). Há uma necessidade de diretrizes padronizadas nesta área.

A utilidade das bactérias orais como marcador de diagnóstico precoce está a atrair a atenção de investigadores. Mager et al. mostraram que as contagens salivares de *Capnocytophaga gingivalis*, *Prevotella melaninogenica* e *S. mitis* anteciparam o cancro oral com sensibilidade de 80%, tornando-se um indicador potencial de diagnóstico de cancro oral (Mager, Haffajee,^[1]_{SEP} Devlin, Norris, Posner & Goodson, 2005). De acordo com um estudo recente, um painel de biomarcadores de *Rothia*, *Haemophilus*, *Corynebacterium*, *Paludibacter*, *Porphyromonas*, *Oribacterium* e *Capnocytophaga* previu a ocorrência de cancro na cavidade oral e cancro da orofaringe com 100% de sensibilidade e 90% de especificidade (Lim, Fukuma, Totsika, Kenny, Morrison & Punyadeera, 2018). As bactérias orais podem levar à deteção precoce, o que, combinado com o tratamento adequado, pode reduzir significativamente a morbilidade e mortalidade do cancro.

Por outro lado, ao contrário de outras bactérias periodontogénicas, *A. actinomycetemcomitans* não é um membro original da bactéria do complexo vermelho nem é frequentemente detetada em pacientes com periodontite ou em indivíduos periodontalmente saudáveis (Ikeda et al., 2020); ou seja, *A. actinomycetemcomitans*, que é uma bactéria periodontogénica raramente detetada, está presente na microbiota oral de pacientes com cancro esofágico. Em relação ao significado clínico desses achados, *A. actinomycetemcomitans* pode revelar-se um biomarcador de diagnóstico. Se a *A. actinomycetemcomitans* da saliva for comprovado como adequado para o rastreamento, a viabilidade do método pode ser melhorada no futuro.

As propriedades carcinogénicas orais de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* estão bem documentadas *in vitro*, bem como em animais experimentais; muitos dos mecanismos subjacentes foram elucidados. Foi sugerido, portanto, que a deteção de *P. gingivalis* e *F. nucleatum* em condições orais potencialmente malignas poderia ser usada como um marcador de risco de transformação maligna. Fatores de virulência como FimA de *P. gingivalis* e FadA de *F. nucleatum* também podem servir como novos alvos para intervenção terapêutica de cancro oral (Perera, Al-hebshi, David, Speicher, Perera & Johnson, 2016).

Avanços recentes na terapêutica do cancro, como terapia direcionada e imunoterapia, aumentaram a esperança de curas para muitos tipos de neoplasias. Os desafios enfrentados pela terapêutica antitumoral atual, como alta toxicidade para células normais, a incapacidade de tratar o tecido tumoral profundo e a possibilidade de induzir resistência aos medicamentos em células tumorais, levaram ao desenvolvimento de abordagens alternativas.

Opções terapêuticas direcionadas ao microbioma, incluindo prebióticos, probióticos, antibióticos e bacteriocinas, foram estudadas, embora os efeitos atribuíveis no esófago na sua maior parte não tenham sido reconhecidos pelos médicos (Steve et al., 2020).

Há evidências crescentes de que a ingestão alimentar tem um efeito profundo no equilíbrio e na atividade do microbioma. Este efeito desempenha um papel fundamental

na redução da indução da disbiose relacionada à cascata de sinalização inflamatória (Lobo, Benjamim, & Oliveira, 2016; Siracusa, Schaltenberg, Villablanca, Huber & Gagliani, 2019). À medida que o papel patogénico da microbiota disbiótica do esófago se torna mais claro, a intervenção terapêutica direcionada usando prebióticos específicos parece promissora, especificamente quando focada no aumento da razão Gram-positivo/Gram-negativo. Pode ser possível, promovendo seletivamente a atividade de certos organismos que produzem metabolitos, proteínas ou peptídeos, que um microbioma local possa ser curado para um estado mais favorável. Foi demonstrado que os isomalto-oligossacarídeos aumentam os números da flora gram-positivas, especialmente de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus spp.* Os prebióticos, incluindo Maltosil-isomaltooligossacarídeo (MIMO), têm como objetivo melhorar a proporção de gram-positivos/gram-negativos no esófago. Este tipo de intervenção demonstrou algum potencial na redução ou eliminação dos sintomas da DRGE numa série de casos (Selling, Swann, Madsen & Oswald, 2018).

Dado que a dieta de longo prazo altera a composição e atividade da microbiota intestinal, a dieta parece ser uma estratégia possível para influenciar as terapias do cancro por meio da modulação de micróbios (David, Maurice, Carmody, Gootenberg, Button, Wolfe, Ling et al., 2014; Gopalakrishnan, Helmink, Spencer, Reuben & Wargo, 2018). Os probióticos foram reconhecidos como uma opção promissora para a sua prevenção e tratamento (Zhang et al., 2013). O uso de probióticos para modificar o microbioma intestinal foi estudado numa variedade de doenças gastrointestinais, e há várias investigações sobre o seu uso para diminuir os sintomas da DRGE. Formulações probióticas que incluem cepas principalmente dentro dos géneros *lactobacillus* e *bifidobacterium* foram estudadas e demonstraram redução nos sintomas quando usadas como monoterapia (Gomi, Yamaji, Watanabe, Yoshioka, Miyazaki, Iwama & Urita, 2018; Ohtsu, Takagi, Uemura, Inoue, Sekino, Kawashima, Uchida et al., 2017). No entanto, muitos estudos são limitados pela qualidade devido a limitações no desenho experimental, como a produção de um placebo adequado para controle (Cheng & Ouwehand 2020). Um estudo controlado randomizado utilizando *bacillus subtilis* e *enterococcus faecium* com PPI (Proton Pump Inhibitors) demonstrou diminuição nos sintomas de diarreia e supercrescimento bacteriano no intestino delgado, mas não reduziu

os sintomas de DRGE ou taxa de cura em comparação com PPI sozinho (Sun, Wang, Sun, Zhang & Zhang, 2019). Além disso, evidências recentes demonstraram que, embora os probióticos administrados por via oral possam permanecer viáveis, pode haver uma resistência marcante do hospedeiro à colonização da mucosa (Zmora, Zilberman-Schapira, Suez, Mor, Dori-Bachash, Bashiardes, Kotler et al., 2018).

Os antibióticos também são uma possível opção terapêutica para modificar o microbioma, dada sua eficácia no tratamento de doenças infecciosas gastrointestinais. Embora o uso rotineiro de antibióticos para o tratamento de doenças esofágicas não tenha sido investigado, ele tem sido usado com sucesso noutras partes do trato gastrointestinal para estados de doença relacionados à disbiose. Em pacientes com supercrescimento bacteriano no intestino delgado (SIBO), uma condição caracterizada pela proliferação da flora comensal dentro do intestino delgado, antibióticos com baixa biodisponibilidade oral, como rifaximina, têm sido usados com eficácia, embora os dados sobre o uso de antibióticos sistêmicos seja limitado (Rao & Bhagatwala, 2019). Dadas as implicações dos novos patógenos resistentes a antibióticos e o risco de colite por *C. difficile*, parece improvável que esta abordagem seja viável para doenças esofágicas (Chang, Kim, Kim, Woo, Ryu, Joo, Lee et al., 2017; McDonald, Gerding, Johnson, Bakken, Carroll, Coffin et al., 2018).

Ao contrário da infecção viral, a infecção bacteriana pode ser eliminada por antibióticos. Nesse sentido, parece que o tratamento com antibióticos pode ser empregado para prevenir, aliviar ou mesmo curar o cancro (Khajuria & Metgud, 2015). Amer et al. (2017) propuseram que a terapia com antibióticos tópicos pode ser uma nova estratégia para prevenir a transformação maligna da leucoplasia oral (Amer, Galvin, Healy & Moran,^[1]_[SEP]2017). É tentador modular o microbioma oral para prevenir o cancro por meio de antibióticos. No entanto, estudos clínicos relataram que a combinação de antibióticos e agentes quimioterápicos pode ser aplicada para tratar vários tipos de cancro. Por exemplo, a aplicação combinada de azitromicina, paclitaxel e cisplatina alcançou resultados desejáveis em termos de efeitos colaterais e sobrevida geral em pacientes com cancro de pulmão (Chu, Yao, Chang, Chou, Chou, Chen, Terng et al., 2014). Além disso, a vacinação é capaz de prevenir a infecção de bactérias etiológicas, servindo como outra

estratégia promissora para a prevenção do cancro esofágico (Khajuria & Metgud, 2015).

Outro caminho possível para intervenção envolve a aplicação de uma bacteriocina, direta ou indiretamente, por meio do fornecimento seletivo de prebióticos a organismos específicos. As bacteriocinas têm potencial de uso por meio de dois mecanismos: (1) efeito antibiótico direto e (2) efeito citotóxico para células neoplásicas. Embora esta seja uma área ativa de pesquisa e isolados inibitórios que têm como alvo o *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina (Okuda, Zendo, Sugimoto, Iwase, Tajima, Yamada, Sonomoto et al., 2013) e *Enterococcus* resistente à vancomicina (Kommineni, Bretl, Lam, Chakraborty, Hayward, Simpson, Cao et al., 2015) foram isolados, mais pesquisas são necessárias sobre produtos que visam organismos específicos, bem como literatura subsequente para avaliar a sua eficácia e segurança (Kommineni et al., 2015).

Evidências crescentes mostraram que os micróbios intestinais podem modular a eficácia da imunoterapia e quimioterapia contra o cancro (Gopalakrishnan, Spencer, ^[1]Helms, Reuben & Wargo 2018). Devido a seus papéis imunossupressores, tanto *P. gingivalis* quanto *F. nucleatum* têm sido apontados como facilitadores da carcinogénese oral. Com relação aos tumores contendo *F. nucleatum*, a proteína Fap2 ligou-se ao receptor inibitório humano TIGIT, levando à inibição da atividade das células imunes (Gur, Ibrahim, Isaacson, Yamin, Abed, Gamliel, Enk, Bar-On et al., 2015). A exposição a *P. gingivalis* potencializou as expressões de moléculas PD-L1 e PD-L2 (ligantes de morte programada 1 e 2) em células OSCC, induzindo a exaustão e apoptose de células T (Teng, Galon, Fridman & Smyth, 2015). Foi demonstrado que os anticorpos monoclonais anti-PD-1 (anti-proteína de morte celular programada 1) melhoraram significativamente a sobrevida global em pacientes com HNSCC (Head and neck squamous cell carcinoma) recorrente ou metastático (Ferris, Blumenschein, Fayette, Guigay, Colevas, Licitra, Harrington et al., 2016; Chow, Haddad, Gupta, Mahipal, Mehra, Tahara, Berger et al., 2016). Portanto, imunoterapias direcionadas a PD-L1, PD-L2 ou TIGIT (Imunorreceptor de células T com domínios Ig e ITIM) podem melhorar o microambiente imunossupressor e inibir o desenvolvimento de cancro.

Tem atraído atenção considerável o uso de microRNAs como agentes terapêuticos contra certos tipos de cancro (Benakanakere, Zhao, et al., 2019). A estimulação de *P.*

gingivalis in vivo levou à superexpressão de miR-663 (Micro ácido ribonucleico 663) (Benakanakere, Zhao, et al., 2019). Além disso, a regulação positiva do miR-663 induziu a apoptose celular em células epiteliais gengivais primárias, bem como na linha celular de cancro de mama MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7), o que o tornou um agente candidato pautativo para o controle do cancro (Benakanakere, Zhao, et al., 2019). Foi demonstrado que o miR-21 (Micro ácido ribonucleico 21) foi regulado positivamente em resposta ao lipopolissacarídeo *P. gingivalis* e aumentou a invasão do carcinoma de células escamosas da língua oral através da via Wnt/ β -Catenina (Zhou, Su, Duan, Chen, Hays, Upadhyayula, Shivde et al., 2018; Kawakita, Yanamoto, Yamada, Naruse, Takahashi, Kawasaki & Umeda, 2014). Portanto, Kawakita et al. (2014) indicaram que miR-21 pode ser um alvo potencial para o tratamento do carcinoma de células escamosas de língua oral.

Outra terapêutica possível trata-se da utilização de bactérias para o tratamento do cancro. Esta foi reduzida anteriormente, principalmente devido ao surgimento da terapia de radiação que entrou em voga nos campos médicos desde a década de 1920. No entanto, o progresso recente nos campos da imunologia e biotecnologia gerou um novo interesse no mecanismo subjacente à atividade das bactérias, trazendo-a à vanguarda dos investigadores. As bactérias podem ser programadas por meio de manipulação genética simples ou bioengenharia sintética sofisticada para produzir e distribuir agentes anti-cancro com base nas necessidades clínicas. As abordagens terapêuticas que usam bactérias direcionadas a tumores podem ser aplicadas como uma monoterapia ao alterar microambientes tumorais e induzir a regressão do tumor ou em combinação com outras terapias anti-cancro para alcançar melhores resultados clínicos (Duong, Qin, You & Min, 2019).

Bactérias vivas direcionadas ao tumor podem colonizar seletivamente tumores ou nódulos linfáticos dirigidos por tumor, inibir o crescimento do tumor e prolongar a sobrevivência após infeção sistêmica em animais. O uso de bactérias direcionadas a tumores como vetores de entrega pode superar as limitações de penetração e maximizar as atividades de fármacos quimioterapêuticos enquanto reduz a toxicidade sistêmica para o hospedeiro. Ao regular a expressão do gene bacteriano, é possível limitar ainda mais o

acúmulo de cargas úteis antitumorais nos locais do tumor, bem como controlar o tempo de entrega do medicamento (Duong et al., 2019).

III. Conclusão

A relação entre as bactérias da cavidade oral e diferentes patologias sistêmicas é amplamente demonstrada em vários estudos epidemiológicos, experimentais e ensaios clínicos, assim como, os mecanismos patofisiológicos comuns dos quais surgem as alterações celulares e químicas induzidas que conduzem a estas patologias.

A transferência de bactérias da cavidade oral para o trato digestivo é comum, estas chegam ao estômago por meio da saliva ingerida, nutrientes e bebidas. Tendo em consideração as semelhanças da composição microbiana e os padrões de translocação comuns entre a cavidade oral e o trato digestivo superior, as alterações nos microrganismos orais podem ser mais informativas quando aplicadas para a detecção de neoplasias do sistema digestivo superior.

As bactérias da cavidade oral desempenham um papel importante no desenvolvimento de cancro oral, colorretal e pancreático. O mais bem confirmado é o efeito carcinogénico dos periopatógenos orais: *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. As bactérias podem ter um efeito oncogénico nas células humanas de três maneiras: levando à inflamação crónica, agindo como um antiapoptótico e produzindo substâncias cancerígenas. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para definir claramente as bactérias orais específicas como cancerígenas.

A sobrevida a longo prazo de pacientes com cancro esofágico permanece baixa. A rápida disseminação para órgãos ou tecidos circunvizinhos e o desenvolvimento assintomático, levam ao diagnóstico desta patologia em estágio avançado. Consequentemente, a triagem, a detecção e o diagnóstico na fase inicial continuam a ser fatores-chave. Assim, é imperativo perceber que através do tratamento e dos cuidados de saúde oral é possível diminuir a prevalência das patologias que têm vindo a ser associadas à presença de certas bactérias. É importante uma ação conjunta de médicos especialistas em prol da saúde geral dos indivíduos, assim como a realização de medidas preventivas.

Assim, é necessário mais trabalho para revelar os padrões de transmissão da cavidade oral para locais distais no corpo humano e a interação entre eles. Um melhor

conhecimento dos mecanismos de como as comunidades da microbiota funcionam e como estão envolvidas no desenvolvimento da doença pode ajudar a identificar novas abordagens preventivas, modulando e controlando bactérias específicas na cavidade oral.

IV. Bibliografia

1. Arjunan, P., Meghil, M.M., Pi, W. et al. (2018). Oral Pathobiont Activates Anti-Apoptotic Pathway, Promoting both Immune Suppression and Oncogenic Cell Proliferation. *Sci Rep* 8, 16607. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35126-8>
2. Chang, Y.C., Chi, L.H., Chang, W.M., Su, C.Y., Lin, Y.F., Chen, C.L., Chen, M.H., Chang, P.M., Wu, A.T., Hsiao, M. (2017). Glucose transporter 4 promotes head and neck squamous cell carcinoma metastasis through the TRIM24-DDX58 axis. *J Hematol Oncol*;10(1):11. <https://doi.org/10.1186/s13045-016-0372-0>.
3. Chen, X., Yuan, Z., Lu, M., Zhang, Y., Jin, L., Ye, W. (2017). Poor oral health is associated with an increased risk of esophageal squamous cell carcinoma - a population-based case-control study in China. *Int J Cancer*, 140(3):626-635. <https://doi.org/10.1002/ijc.30484>.
4. Chen, Y., Chen, X., Yu, H., Zhou, H., Xu, S. (2019). Oral Microbiota as Promising Diagnostic Biomarkers for Gastrointestinal Cancer: A Systematic Review. *Onco Targets Ther*, 12:11131-11144. <https://doi.org/10.2147/OTT.S230262>
5. Coker, O., Dai, Z., Nie, Y., Zhao, G., Cao, L., Nakatsu, G., Wu, W.K., Wong, S.H., Chen, Z., Sung, J.J.Y. & Yu, J. (2017). Mucosal microbiome dysbiosis in gastric carcinogenesis. *Gut*, 67(6):1024-1032. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-314281>.
6. Costa, D.L.S. (2010). Papel da inflamação no desenvolvimento tumoral: potencial terapêutico dos inibidores da COX-2 [Tese de Mestrado não publicada]. Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.
7. Cunha P. F. P. G. (2019). BACTÉRIAS PERIODONTOPATOGÊNICAS E A INFLUÊNCIA DESTAS NO DESENVOLVIMENTO DE PATOLOGIAS SISTÊMICAS [Tese de Mestrado não publicada]. Instituto Universitário Egas Moniz.
8. D'Souza, S.M., Cundra, L.B., Yoo, B.S., Parekh, P.J., Johnson, D.A. (2020). Microbiome and Gastroesophageal Disease: Pathogenesis and Implications for Therapy. *Ann Clin Gastroenterol Hepatol*, 4: 020-033.

9. Diomedea, F., Zingariello, M., Cavalcante M., Merciaro, I., Pizzicannella, J., Isla, N., Caputi, S., Ballerini, P., & Trubiani, O. (2017). MyD88/ERK/NFkB pathways and pro-inflammatory cytokines release in periodontal ligament stem cells stimulated by *Porphyromonas gingivalis*. *European Journal of Histochemistry*, 61:2791
10. Duong, M.T.Q., Qin, Y., You, S.H. *et al.* (20129). Bacteria-cancer interactions: bacteria-based cancer therapy. *Exp Mol Med*, 51, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s12276-019-0297-0>
11. Faïs, T., Delmas, J., Serres, A., Bonnet, R. & Dalmasso, G. (2016). Impact of CDT Toxin on Human Diseases. *Toxins (Basel)*, 8(7):220. doi: 10.3390/toxins8070220.
12. Flanagan L., Schmid J., Ebert M., Soucek P., Kunicka T., Liska V., Bruha J., Neary P., Dezeuw N., Tommasino M., Jenab M., Prehn J.H., Hughes D.J. (2014). *Fusobacterium nucleatum* associates with stages of colorectal neoplasia development, colorectal cancer and disease outcome. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*.33(8):1381-90. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2081-3>.
13. Gao, S., Li, S., Ma, Z., Liang, S., Shan, T., Zhang, M., Zhu, X., Zhang, P., Liu, G., Zhou, F., Yuan, X., Jia, R., Potempa, J., Scott, D.A., Lamont, R.J., Wang, H., Feng, X. (2016). Presence of *Porphyromonas gingivalis* in esophagus and its association with the clinicopathological characteristics and survival in patients with esophageal cancer. *Infect Agent Cancer*, 11:3. <https://doi.org/10.1186/s13027-016-0049-x>.
14. Gao, S.G., Yang, J.Q., Ma, Z.K., Yuan, X., Zhao, C., Wang, G.C., Wei, H., Feng, X.S., Qi, Y.J. (2018). Preoperative serum immunoglobulin G and A antibodies to *Porphyromonas gingivalis* are potential serum biomarkers for the diagnosis and prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer*, 18(1):17. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3905-1>.
15. Gluszek, S., Kot, M., Kotucha, B., Stepień, R. & Koziel, D. (2014). Cancer of the oesophagus and gastroesophageal junction – a difficult clinical problem. *Contemp Oncol (Pozn)*. 18(5): 349–354.
16. Gonçalves, M., Cappellari, A.R., Júnior, A.A.S., Marchi, F.O., Macchi, F.S., Antunes, K.H., Souza, A.P.D., & Morrone, F.B. (2016). Effect of LPS on the

- Viability and Proliferation of Human Oral and Esophageal Cancer Cell Lines. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59:16150485.
17. Goradel, N.H., Heidarzadeh, S., Jahangiri, S., Farhood, B., Mortezaee, K., Khanlarkhani, N. & Negahdari, B. (2018) *Fusobacterium nucleatum* and colorectal cancer: A mechanistic overview. *J Cell Physiol*, 234(3):2337-2344. <https://doi.org/10.1002/jcp.27250>.
 18. Hoare, A., Soto, C., Rojas-Celis, V., & Bravo, D. (2019). Chronic Inflammation as a Link between Periodontitis and Carcinogenesis. *Mediators of Inflammation*, 2019: 14.
 19. Jiang, S., Hu, Y., Deng, S., Deng, J., Yu, X., Huang, G., ... Han, X. (2018). *miR-146a regulates inflammatory cytokine production in Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide-stimulated B cells by targeting IRAK1 but not TRAF6. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis*
 20. Johansson, A. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin: A Powerful Tool with Capacity to Cause Imbalance in the Host Inflammatory Response. (2011) *Toxins*, 3, 242-259. <https://doi.org/10.3390/toxins3030242>
 21. Kageyama, S., Takeshita, T., Takeuchi, K., Asakawa, M., Matsumi, R., Furuta, M., Shibata, Y., Nagai, K., Ikebe, M., Morita, M., Masuda, M., Toh, Y., Kiyohara, Y., Ninomiya, T., & Yamashita, Y. (2019). Characteristics of the Salivary Microbiota in Patients With Various Digestive Tract Cancers. *Frontiers in microbiology*, 10, 1780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01780>
 22. Karpiński, T.M. (2019). Role of Oral Microbiota in Cancer Development. *Microorganisms*, 7, 20. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010020>
 23. Kawasaki, M., Ikeda, Y., Ikeda, E., Takahashi, M., Tanaka, D., Nakajima, Y., Arakawa, S., Izumi, Y. & Miyake, S. (2021). Oral infectious bacteria in dental plaque and saliva as risk factors in patients with esophageal cancer. *Cancer*, 127(4):512-519. <https://doi.org/10.1002/cncr.33316>.
 24. Kuboniwa, M., Hasegawa, Y., Mao, S., Shizukuishi, S., Amano, A., Lamont, R.J., & Yilmaz, O. (2008). *P. gingivalis* accelerates gingival epithelial cell progression through the cell cycle. *Microbes Infect.*, 10(2): 122–128.

25. Lamont, R.J., Koo, H. & Hajishengallis, G. (2018). The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nat Rev Microbiol*, 16(12):745-759. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0089-x>.
26. Le Bars, P., Matamoros, S., Montassier, E., Le Vacon, F., Pote, I G., Soueidan, A., Jordana, F., & de La Cochetière, MF. (2017). The oral cavity microbiota: between health, oral disease, and cancers of the aerodigestive tract. *Can J Microbiol*, 63(6):475-492. <https://doi.org/10.1139/cjm-2016-0603>
27. Littman, D.R., Eric G. & Pamer, E.G. (2011). Role of the Commensal Microbiota in Normal and Pathogenic Host Immune Responses. *Cell Host & Microbe*, 10(4): 311-323.
28. Liu, X., Gao, Z., Sun, C. *et al.* (2019). The potential role of *P.gingivalis* in gastrointestinal cancer: a mini review. *Infect Agents Cancer* 14, 23. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0239-4>.
29. Malinowski, B., Węsierska, A., Sokolowska, M.M. & Zalewska, K. (2019). The role of *Tannerella forsythia* and *Porphyromonas gingivalis* in pathogenesis of esophageal cancer. *Infect Agents Cancer*, 14, 3. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0220-2>
30. Mao, S., Park, Y., Hasegawa, Y., Tribble, G. D., James, C. E., Handfield, M. & Lamont, R. J. (2007). *Intrinsic apoptotic pathways of gingival epithelial cells modulated by Porphyromonas gingivalis*. *Cellular Microbiology*, 9(8), 1997–2007. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2007.00931.x>
31. Meurman, J.H. (2010). Oral microbiota and cancer. *Journal of Oral Microbiology*, 2:1, <https://doi.org/10.3402/jom.v2i0.5195>.
32. Moffatt C. E., Lamont R. J. (2011). *Porphyromonas gingivalis* Induction of MicroRNA-203 Expression Controls Suppressor of Cytokine Signaling 3 in Gingival Epithelial Cells. *Infection and immunity*, p. 2632–2637
33. Moghimi, M., Bakhtiari, R., Mehrabadi, J.F., Jamshidi, N., Jamshidi, N., Siyatpanah, A., Mitsuwan, W. & Nissapatorn, V. (2020). Interaction of human oral cancer and the expression of virulence genes of dental pathogenic bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 149. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104464>.

34. Olsen, I., Yilmaz, Ö. (2019). Possible role of *Porphyromonas gingivalis* in orodigestive cancers. *J Oral Microbiol*, 11(1):1563410. <https://doi.org/10.1080/20002297.2018.1563410>.
35. Perera, M., Al-hebshi, N.N., David J. Speicher, D.J., Perera, I., & Newell W. Johnson (2016) Emerging role of bacteria in oral carcinogenesis: a review with special reference to perio-pathogenic bacteria, *Journal of Oral Microbiology*, 8:1, 32762. <https://doi.org/10.3402/jom.v8.32762>
36. Peters, B.A., Wu, J., Pei, Z., Yang, L., Purdue, M.P., Freedman, N.D., Jacobs, E.J., Gapstur, S.M., Hayes, R.B., Ahn, J. (2017). Oral Microbiome Composition Reflects Prospective Risk for Esophageal Cancers. *Cancer Res*, 77(23):6777-6787. <https://doi.org/10.1158/0008-5472>.
37. Qi Y., Jiao Y., Chen P., Kong J., Gu B., Liu K., Feng D., Zhu, Y., Ruan H., Lan, Z., Liu Q., Mi, Y., Guo, X., Wang, M., Liang, G., Lamont, R.J., Wang, H, Zhou, F., Feng, X., & Gao, S. (2020) *Porphyromonas gingivalis* promotes progression of esophageal squamous cell cancer via TGF β -dependent Smad/YAP/TAZ signaling. *PLoS Biol* 18(9): e3000825. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000825>
38. Rita Costa Martins, R.C. (2017). CANCERIZAÇÃO EM CAMPO: CONCEITO E IMPLICAÇÕES CLÍNICAS NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CABEÇA E PESCOÇO [Tese de Mestrado não publicada]. Instituto Universitário Egas Moniz.
39. Sasaki, M., Kodama, Y., Shimoyama, Y., Ishikawa, T. & Kimura, S. (2018). Aciduricity and acid tolerance mechanisms of *Streptococcus anginosus*. *J Gen Appl Microbiol*, 64(4):174-179. <https://doi.org/10.2323/jgam.2017.11.005>.
40. Shinya, K., Toru, T., Kenji T., Mikari, A., Rie, M., Michiko, F., Yukie, S., Kiyoshi, N., Masahiko, I., Masaru, M., Muneyuki, M., Yasushi, T., Yutaka, K., Toshiharu, N., Yoshihisa, Y. (2019). Characteristics of the Salivary Microbiota in Patients With Various Digestive Tract Cancers. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1780. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01780>
41. Shirjang, S., Mansoori, B., Asghari, S., Duijf, P. H. G., Mohammadi, A., Gjerstorff, M., & Baradaran, B. (2019). *MicroRNAs in cancer cell death*

- pathways: Apoptosis and necroptosis. Free Radical Biology and Medicine.*
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2019.05.017>
42. Silva, A.P.S. (2014). Importância da apoptose nas neoplasias hematopoiéticas. Metodologias usadas e novos fármacos [Tese de Mestrado não publicada]. Universidade de Lisboa.
 43. Teshima, R., Hanada, K., Akada, J., Kawano, K., Yamaoka, Y. (2018). Aggregatibacter actinomycetemcomitans infection causes DNA double-strand breaks in host cells. *Genes Cells*, 23(4):264-273.
<https://doi.org/10.1111/gtc.12570>
 44. Vanessa, G., Inge, D., Jacques, D., Jerry, W.S., Laurence, H., Gladys, M. & Julien, V. (2016). Genotoxicity of Cytolethal Distending Toxin (CDT) on Isogenic Human Colorectal Cell Lines: Potential Promoting Effects for Colorectal Carcinogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6, 34.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00034>
 45. Wara-aswapati, N., Chayasadam, A., Surarit, R., Pitiphat, W., Boch, J. A., Nagasawa, T., Ishikawa, I. & Izumi, Y. (2013). *Induction of Toll-Like Receptor Expression by Porphyromonas gingivalis. Journal of Periodontology*, 84(7), 1010-1018. <https://doi.org/10.1902/jop.2012.120362>
 46. Whitmore, S.E., & Lamont, R.J. (2014). Oral Bacteria and Cancer. *PLoS Pathog*, 10(3): e1003933. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.100393>
 47. Yamamura, K., Baba, Y., Nakagawa, S., Mima, K., Miyake, K., Nakamura, K., Sawayama, H., Kinoshita, K., Ishimoto, T., Iwatsuki, M., Sakamoto, Y., Yamashita, Y., Yoshida, N., Watanabe, M., & Baba, H. (2016). Human Microbiome Fusobacterium Nucleatum in Esophageal Cancer Tissue Is Associated with Prognosis. *Clin Cancer Res*, 22(22):5574-5581.
<https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-1786>.
 48. Yuan, X., Liu, Y., Li, G., Lan, Z., Ma, M., Li, H., Kong, J., Sun, J., Hou, G., Hou, X., Ma, Y., Ren, F., Zhou, F., & Gao, S. (2019). Blockade of Immune-Checkpoint B7-H4 and Lysine Demethylase 5B in Esophageal Squamous Cell Carcinoma Confers Protective Immunity against *P. gingivalis* Infection. *Cancer Immunol Res*, 7(9):1440-1456. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-18-0709>.

49. Zhang W., Wang S., Wang H., Tang Y., Tang Y. & Liang X. (2019). Who is who in oral cancer? *Experiment Cell Research*, 384, 2
<https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2019.111634>
50. Zhang, W., Wang, S., Wang, H., Tang, Y., Tang, Y., Liang, X. (2019). Who is who in oral cancer? *Experimental Cell Research*, 384, 2, 111634.
51. Zhong S., ChengLong X., Wei T.S., Woei L.J.C., Suresh K., Karuppiah T. (2019). Mechanisms of Oral Bacterial Virulence Factors in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9.
52. Zhong, S., ChengLong, X., Wei, T.S., Woei, L.J.C., Suresh, K. & Karuppiah, T. (2019). Mechanisms of Oral Bacterial Virulence Factors in Pancreatic Cancer. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 412.
<https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00412>
53. Zhou, Y., & Luo, G.H. (2019). Porphyromonas gingivalis and digestive system cancers. *World J Clin Cases*, 7(7): 819-829